

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-080201

(43)Date of publication of application : 13.03.1992

(51)Int.Cl.

C08B 37/08  
A61K 31/725  
A61K 31/73  
C08B 37/00  
C08B 37/10

(21)Application number : 02-193817

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 24.07.1990

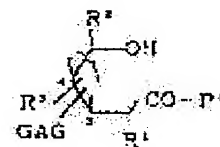
(72)Inventor : SAKURAI KATSUKIYO  
SUGIURA NOBUO  
KIMATA HIROHARU  
SUZUKI AKIRA

## (54) PHOSPHOLIPID OR GLYCOSAMINOGLYCAN BONDED TO PHOSPHOLIPID

## (57)Abstract:

PURPOSE: To prevent adhesion of cancerous cells to hemangioendotheliocytes or ectocytic matrices and make use as a preventive of cancer metastasis by providing a phospholipid having a specific structural formula.

CONSTITUTION: One mole of glycosaminoglycan is reacted with 2-20 equivalents of an oxidizing agent at 0-40° C and treated with an acid to give a lactone compd., which is reacted with a phospholipid having a primary amino group to give (a) (salt of) a phospholipid-bonded glycosaminoglycan of the formula [wherein P1 is a phospholipid having a primary amino group; when GAG is a glycosaminoglycan residue formed by removing a glucuronic acid part having a reducing terminal group from hyaluronic acid, chondroitin (sulfate A, C, or E), dermatan sulfate, heparin, or heparan sulfate or when GAG is a glycosaminoglycan residue formed by removing an iduronic acid part having a reducing terminal group from dermatan sulfate, GAG is attached to the 4-position and R3 to the 3-position; R1 is OH; R2 is COOH; and R3 is OH].



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-80201

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

C 08 B 37/08  
A 61 K 31/725  
31/73

識別記号

Z  
ADU

庁内整理番号

7624-4C  
9164-4C  
9164-4C※

⑭ 公開 平成4年(1992)3月13日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全35頁)

⑮ 発明の名称 燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン

⑯ 特 願 平2-193817

⑰ 出 願 平2(1990)7月24日

⑱ 発 明 者 桜 井 勝 清 東京都東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社  
東京研究所内

⑲ 発 明 者 杉 浦 信 夫 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子  
医科学研究所内

⑲ 発 明 者 木 全 弘 治 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子  
医科学研究所内

⑲ 発 明 者 鈴 木 旺 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子  
医科学研究所内

⑳ 出 願 人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

㉑ 代 理 人 弁理士 津 国 肇 外1名

最終頁に続く

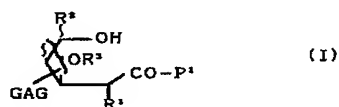
# 明 細 書

## 1. 発明の名称

燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン

## 2. 特許請求の範囲

### 1. 一般式

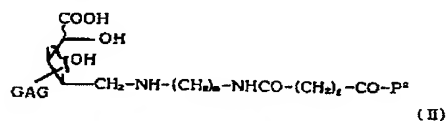


を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R<sup>1</sup>はOH、OSO<sub>3</sub>H、NHCOCH<sub>3</sub>又はNH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Hを示し、R<sup>2</sup>はCOOH、CH<sub>2</sub>OH又はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>Hを示し、R<sup>3</sup>は水素又はSO<sub>3</sub>Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、D、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、セラタン硫酸又はセラタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分又はウロン酸部分もしくは

ガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P<sup>3</sup>は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

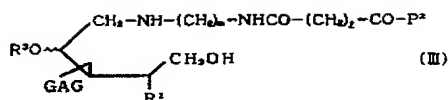
### 2. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、セラタン硫酸又はセラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、mは1~8を示し、nは1~10を示し、P<sup>4</sup>は燐脂質又は脂質を示す。

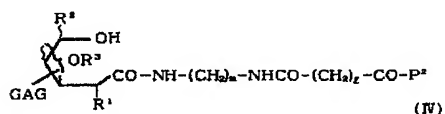
### 3. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $\text{R}^1$  は  $\text{OH}$  又は  $\text{NHCOCH}_3$  を示し、 $\text{R}^2$  は水素又は  $\text{SO}_3\text{H}$  を示し、 $\text{GAG}$  はヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A もしくは  $\text{K}$  又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、 $m$ 、 $n$  及び  $\text{P}^2$  は請求項 2 に記載と同じである。

#### 4. 一般式

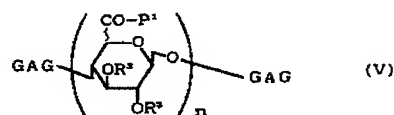


を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカ

ン又はその塩。

上記式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  及び  $\text{GAG}$  は請求項 1 に記載と同じであり、 $m$ 、 $n$  及び  $\text{P}^2$  は請求項 2 に記載と同じである。

#### 5. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $\text{R}^3$  は水素又は  $\text{SO}_3\text{H}$  を示し、 $\text{GAG}$  はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、C、D、E もしくは  $\text{K}$ 、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸中のグリコサミノグリカン鎖を示し、 $\text{P}^1$  は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示し、 $n$  はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下の数を示す。

#### 3. 発明の詳細な説明

##### 〔産業上の利用分野〕

本発明は、癌転移抑制剤として有用な燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩に関する。

##### 〔従来の技術〕

癌転移は、血管内やリンパ管内に流出した癌細胞が、血管内皮細胞やその下の基底膜と呼ばれる血管内皮細胞の細胞外マトリックスと接着し、接着した癌細胞が細胞外マトリックス内に浸潤、透過して新しい組織内に転移巣をつくることが知られている。例えば S. Korach らは (Cancer Research 46, 3624-3629, (1986)) 癌細胞のクローニングで高転移性細胞と低転移性細胞の群に分け、培養内皮細胞に対する *in vitro* での接触試験で、高転移性の癌細胞は高い接着率を示し、低転移性のものは低い接着率を示すことから、血管内皮細胞やその細胞外マトリックスに対する接着性が癌の転移と深くかかわっていることを報告している。

また、細胞外マトリックス成分であるフィ

ブロンネクチンの細胞接着部位にあるペプチド・GRGDS は、拮抗的に細胞と細胞外マトリックスとの結合を阻害する。山田らは (Science 233, 467-470, (1986)) このペプチド・GRGDS が B16F10 細胞のマウスにおける肺転移を抑制することを示している。このことから、非常に微量で細胞接着阻害活性を持つ物質は癌転移抑制剤として利用し得ることを示唆している。

##### 〔発明が解決しようとする課題〕

本発明は、燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンが、上記の癌細胞の血管内皮細胞や細胞外マトリックスへの接着を阻害することにより、癌の転移を抑制する知見を得て本発明をなした。

##### 〔課題を解決するための手段〕

本発明は、下記燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩である。

グリコサミノグリカンは表 1 に示すように、D-グルコサミン又は D-ガラクトサミンと、D-グルクロン酸、L-イソグルロン酸及び/又は D-ガラクトースの 2 糖又は 4 糖の繰り返し単位

より構成されている長い鎖状の多糖であり、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C、コンドロイチン硫酸 D、コンドロイチン硫酸 E、コンドロイチン硫酸 K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸及びセラタン硫酸、セラタンポリ硫酸が知られている。

表 1

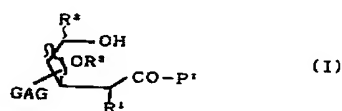
グリコサミノグリカン	ヘキソサミン	ウロン酸
ヒアルロン酸 (MW1000~1000万)	GlcNAc	GlcUA
コンドロイチン (MW1000~10万)	GalNAc	GlcUA
コンドロイチン硫酸 A (MW1000~10万)	GalNAc (4S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸 C (MW1000~10万)	GalNAc (6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸 D (MW1000~10万)	GalNAc (4S)	GlcUA (2S)
コンドロイチン硫酸 E (MW1000~10万)	GalNAc (4S, 6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸 K (MW1000~10万)	GalNAc (4S)	GlcUA (3S)
コンドロイチンポリ硫酸 (MW1000~15万)	GalNAc (S)	GlcUA (S)
デルマタン硫酸 (MW1000~2 万)	GalNAc (4S)	IduUA, GlcUA
ヘパリン (MW1000~2 万)	GlcNS (6S)	GlcUA, IduUA (2S)
ヘパラン硫酸 (MW1000~2 万)	GlcNS (NAc, S)	GlcUA, IduUA (2S)
セラタン硫酸 (MW1000~2 万)	GlcNAc (6S)	Gal
セラタンポリ硫酸 (MW1000~2 万)	GlcNAc (6S)	Gal (6S)

GlcNAc : D-グルコサミン N-アセチル  
GalNAc : D-ガラクトサミン N-アセチル  
GlcNS : D-グルコサミン N-硫酸  
GlcUA : D-グルクロン酸  
IduUA : L-イソロン酸  
Gal : D-ガラクトース  
S : オ-硫酸

本発明の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩；トリアルキルアミン、ピリジンのようなアミン塩であることができる。

本発明の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンは、次のものを包含する。

一般式

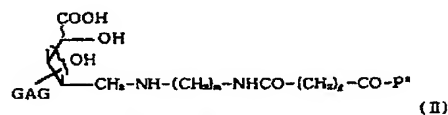


を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R<sup>1</sup>はOH、OSO<sub>3</sub>H、NHCOCH<sub>3</sub>又はNH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Hを示し、R<sup>2</sup>はCOOH、CH<sub>2</sub>OH又はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>Hを示し、R<sup>3</sup>は水素又はSO<sub>3</sub>Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、セラタン硫酸又はセラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、mは

酸 A、C、D、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、セラタン硫酸又はセラタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分又はウロン酸部分もしくはガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P<sup>1</sup>は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

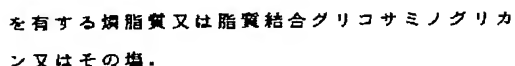
一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、セラタン硫酸又はセラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、mは

### 一 般 式



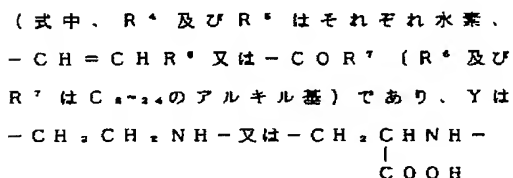
上記式中、R'はOH又はNHCOCH<sub>3</sub>を示し、R<sup>\*</sup>は水素又はSO<sub>3</sub>Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはセラタン硫酸又はセラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、m、*l*及びP<sup>\*</sup>は式(II)に記載と同じである。

### 一般式

アミノ基を有する燐脂質を示し、nはグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下の数を示す。

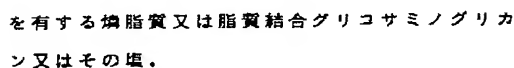
グリコサミノグリカンの分子量は好ましくは表 1 に記載のものが用いられる。

上記式 (I) 及び (V) の  $P^{-1}$  で示される 1 級アミノ基を有する燐脂質としては、



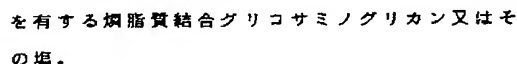
である)

で示されるものが用いられる。特に  $R^*$  及び  $R^*$  がともにヘキサデカノイル又はオクタデカノイルのような  $-COOR^*$  であるか、 $R^*$  が



上記式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 及びGAGは式(Ⅰ)に記載と同じであり、 $m$ 、 $q$ 及び $P^2$ は式(Ⅱ)に記載と同じである。

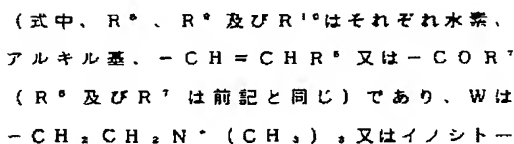
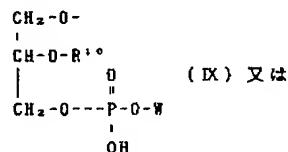
### 一般式



上記式中、 $R^2$  は水素又は $SO_3$ 、 $H$ を示し、 $GAG$ はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、C、D、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸中のグリコサミノグリカン鎖を示し、 $P^1$ は1級

$-CH=CHR^*$  で  $R^*$  が  $-COR^*$  であるものが好ましい。

また、上記式 (II)、(III) 及び (IV) の  $P^2$  で示される樹脂質又は脂質としては、



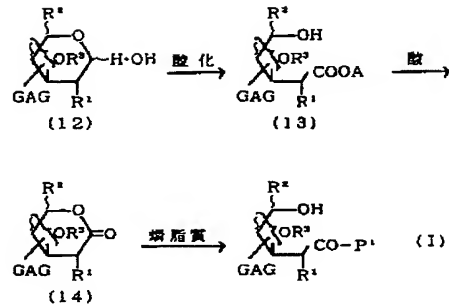
ル残基である)

で示されるものが用いられる。特に  $R^2$  及び  $R^{10}$  がともにヘキサデカノイル又はオクタデカノイルのような  $-COR^7$  であるか、 $R^2$  が水素で、 $R^7$  が  $-COR^7$  である式 (VII) 又は (VIII) の脂質、或いは  $R^{10}$  が  $-COR^7$  である式 (IX) 又は (X) の脂質が好ましい。

以下に、本発明の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造法について詳しく説明する。

#### 還元末端ラクトン化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端ウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を酸化することにより該末端糖部分を開裂させ、更にラクトンを形成させて、このラクトンと脂質の1級アミノ基との反応により脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^3$  は前述と同じ、 $P^1$  は1級アミノ基を有する脂質を示す)

本方法において、先ず、式 (12) で示されるグリコサミノグリカンを酸化して還元性末端部分を開裂させ、式 (13) のカルボキシ化合物とする。

式 (12) のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン、ヘパラン硫酸、

ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用することができる。

この酸化に使用しうる酸化剤としては、ヨウ素、臭素等を用いることができる。

酸化剤の使用量は、式 (12) の化合物1モルに対して2~20当量、好ましくは5~15当量の範囲である。

酸化反応における溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 等を用いることができる。

酸化反応温度は、0~40℃、好ましくは15~20℃で行うことができる。

生成する式 (13) の化合物は、次いで酸で処理することにより式 (14) のラクトン化合物にすることができる。

ここで用いることのできる酸としては、強酸性陽イオン交換樹脂、例えばダウエックス50、アンバーライトIR120等を挙げることができる。

得られる式 (14) のラクトン化合物は、次の

で脂質と反応させることにより、前記一般式 (1) の脂質結合グリコサミノグリカンを製造することができる。

上記反応に用いることのできる脂質としては、L-( $\alpha$ -ホスファチル)エタノールアミン、DL-ホスファチル-L-セリン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン等を用いることができる。

式 (14) のラクトン化合物と脂質との反応は、水、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 又はジメチルホルムアミド等に溶解した式 (14) のラクトン化合物と、クロロホルム等に溶解した脂質とを混合して均一な溶液にし、5~80℃、好ましくは30~60℃の温度で反応させることにより一般式 (1) の化合物を製造することができる。

#### 還元末端アミン法

この方法は、次の還元末端限定酸化法で製造される式 (3)、(6)、(9) 及び (10) のアルデヒド化合物又は前記式 (14) のラクトンに

特開平 4-80201 (6)

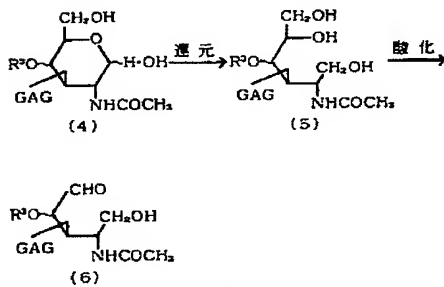
アルキレンジアミンを反応させ、末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とし、次にこの1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシ基をもつ燐脂質又は脂質誘導体とを反応させ、アミノ基とカルボキシ基との結合により、燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

アルデヒド化合物は次のようにして製造される。

還元末端限定酸化法

グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を還元及び部分酸化することにより開裂させてアルデヒドを形成させる方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

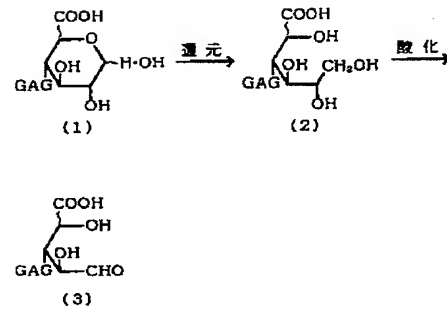
(A) 還元性末端糖のグルクロン酸又はイズロン酸に反応する場合



(式中、R' は前述と同じ)

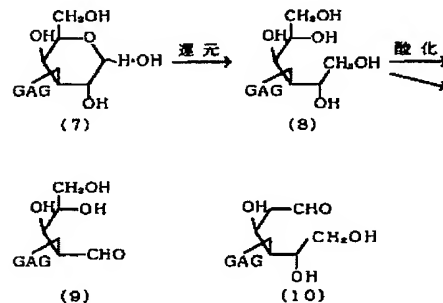
還元性末端のC-5にCH<sub>2</sub>OHを有するグルコサミン又はガラクトサミンである式(4)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(6)のアルデヒド化合物が製造できる。

(C) 還元性末端糖のガラクトースに反応する場合



還元性末端がC-2にOHを有するD-グルクロン酸又はL-イズロン酸である式(1)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパリン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(3)のアルデヒド化合物が製造できる。

(B) 還元性末端糖のグルコサミン又はガラクトサミンに反応する場合



上記反応式に従い、式(9)及び(10)のアルデヒド化合物が製造できる。

上記(A)、(B)及び(C)の方法においては、先ず、上記式(1)、(4)及び(7)で示されるグリコサミノグリカン還元して還元性末端糖部分を開裂させて式(2)、(5)及び(8)の化合物とする。

この還元使用しうる還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩等を用いることができる。

特開平4-80201(7)

また、上記還元反応における溶媒は、水又は0.05Mホウ酸塩緩衝液(pH8.3)等を用いることができる。

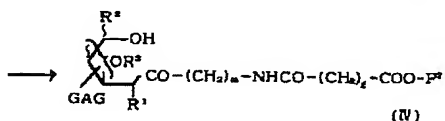
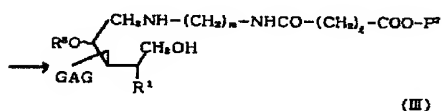
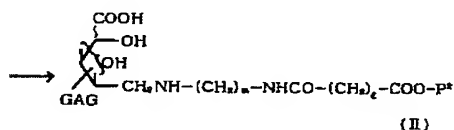
また還元反応温度は、通常10~30℃、好ましくは15~25℃で行うことができる。

還元剤の使用量は、その種類等によっても異なるが、一般には式(1)、(4)又は(7)の化合物1モルに対して5~50当量、好ましくは25~30当量の範囲である。

得られる式(2)、(5)及び(8)の化合物を次いで部分的に酸化すると、式(3)、(6)、(9)及び(10)のアルデヒド化合物が生成する。

この酸化反応に使用しうる酸化剤としては、過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなどの過ヨウ素酸アルカリ塩等を用いることができる。

酸化剤の使用量は、式(2)、(5)又は(8)の化合物1モルに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の範囲である。

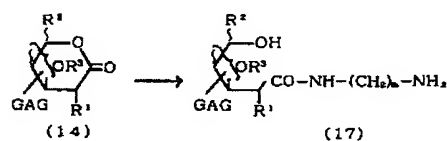
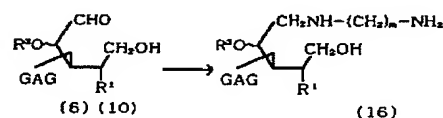
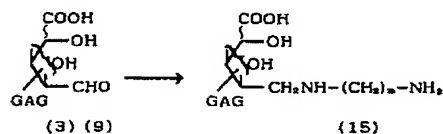


(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は前述と同じ、P<sup>\*</sup>は磷脂質又は脂質を示す)

還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体式(15)、(16)及び(17)は、前記還元末端限定酸化法又は還元末端ラクトン化法によって製造される式(3)、(9)、(6)、(10)及び(14)の化合物とアルキレンジアミンとを還元剤の存在下で反応させるこ

酸化反応温度は、0~10℃、好ましくは0~4℃の範囲で行うことができる。

更に還元末端アミン法を反応式で示せば次のとおりである。



とによって得られる。

この反応に使用できるアルキレンジアミンとしては一般式



(式中、mは1~8の整数)

で示される化合物を用いることができる。

還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いることができる。

還元剤の使用量は、上記反応に使用するグリコサミノグリカンのモル数の10~100倍モル量である。

反応溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液等を用いることができる。

反応温度は、0~60℃、好ましくは4~25℃で行う。

また、カルボキシ基をもつ磷脂質又は脂質誘導体は、グリセロール骨格に水酸基をもつ磷脂質又は脂質とジカルボン酸又はジカルボン酸の無水物とを反応させて得られる。

この反応に使用できる磷脂質又は脂質として



## 特開平 4-80201 (8)

は、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、リゾホスファチジルコリン又はリゾホスファチジルイノシトール、エーテル脂質又はエーテル燐脂質等を用いることができる。

ジカルボン酸としては、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸等を用いることができる。

無水ジカルボン酸としては、無水マレイン酸、無水コハク酸、無水フマル酸等を用いることができる。

縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

反応溶媒としては、クロロホルム、アセトアニリド、ジメチルホルムアミド等を用いることができる。

反応温度は、縮合剤の存在下でジカルボン酸を使用するときは0～60℃を、また無水ジカルボン酸を使用するときは20～80℃で行うことができる。

縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

反応温度は、0～60℃で行う。

上記方法によって得られたカルボキシ基が活性化された上記燐脂質誘導体と、1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体(15)(16)又は(17)とを反応させれば、燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン(II)、(III)及び(IV)を得ることができる。

上記反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

また反応温度は、0～60℃で行う。

### 縮合剤使用法

ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸以外のグリコサミノグリカンはD-グルクロン酸又はL-イズロン酸を含有し、これらのウロン酸はC-5にカルボキシ基を有する。

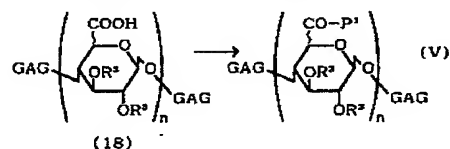
還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシ基をもつ燐脂質又は脂質誘導体とを反応させる方法は、先ず該燐脂質又は脂質誘導体をペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って該燐脂質又は脂質誘導体のカルボキシ基を活性化し、次いで該グリコサミノグリカン誘導体と反応させる方法で行うことができる。

上記燐脂質又は脂質誘導体のカルボキシ基を活性化する方法としては、上記燐脂質又は脂質誘導体とN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシピペリジン、N-ヒドロキシスクシンアミド、2,4,5-トリクロロフェノール等とを縮合剤の存在下で反応させ、該カルボキシ基を活性エステルに変える方法で行うことができる。

反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

この方法は、ウロン酸のカルボキシ基と燐脂質の1級アミノ基とを縮合剤の存在下で反応させ、燐脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

この方法を反応式で示せば次のとおりである。



(式中、R<sup>2</sup>及びP<sup>1</sup>は前述と同じ)

本方法で原料として用いることのできるグリコサミノグリカン(18)は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン又はヘパリン硫酸である。

燐脂質としては、前記還元末端ラクトン化法において例示したものをを用いることができる。

## 特開平 4-80201 (9)

縮合剤としては、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、メチルプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ヘキサメチレンカルボジイミド、ヘプタメチレンカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド、メソ-p-トルエンスルホネート、1-tert-ブチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジフェニルカルボジイミド、4,4'-ジニトロジフェニルカルボジイミド、ジ-p-トリルカルボジイミド又はビス(トリメチルシリル)カルボジイミド等を挙げる事ができる。

縮合剤の使用量は、燐脂質又は脂質の使用モル量の10~100倍モル量を用いることができる。

溶媒としては、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液等を用いることができる。

フェノール等を縮合剤の存在下で反応させて、該カルボキシ基を活性エステルに変えることができる。

ウロン酸部分のカルボキシ基はそのアミン塩として反応させることもできる。

アミン塩のアミンの種類としては、トリ(n-ブチル)アミン、トリエチルアミン、ピリジン等を挙げる事ができる。

反応溶媒としては、ジメチルホルムアミド、ピリジン、ジメチルスルホキシド等を用いることができる。

縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

反応温度は、0~60℃、好ましくは4~20℃で行う。

上記方法によって得られた、カルボキシ基が活性化されたグリコサミノグリカン燐脂質と反応させれば、一般式(V)の燐脂質結合グリコサミ

ノグリカンを得ることができる。

### グリコサミノグリカン活性化法

この方法は、上記縮合剤使用法と同様に、ウロン酸のカルボキシ基を活性化し、燐脂質の1級アミノ基と結合させることにより、燐脂質結合グリコサミノグリカン(V)を製造する方法である。

本方法で使用する事の出来るグリコサミノグリカン及び燐脂質としては、上記縮合剤使用法と同様のものを用いることができる。

カルボキシ基を活性化する方法としては、ペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って、グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシ基を活性化することができる。

活性化する方法としては、例えばグリコサミノグリカンにN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシビベリジン、N-ヒドロキシスクシンアミド、2,4,5-トリクロロ

ノグリカンを得ることができる。

上記反応は、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液の溶液において、上記活性化グリコサミノグリカンと燐脂質とを0~90℃、好ましくは25~60℃で反応させる。

また、本発明の一般式(I)~(V)で示される燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの燐脂質又は脂質の含有量は、0.005~50%、好ましくは2~10%の範囲である。

以上に述べた各種の方法で製造される燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの分離、精製方法としては、反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱物を浮取することで未反応の燐脂質又は脂質を除き、さらに該沈澱物を疎水クロマトに負荷し、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム又は塩化ナトリウム等の塩の水溶液で洗浄することで未反応のグリコサミノグリカン除去する。その後、該疎水クロマトに吸着した燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを10~50%メタノール水溶液で溶出する方法で行う

## 特開平 4-80201 (10)

ことができる。

本発明の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬学的に許容される塩を、固体又は液体の医薬用担体又は希釈剤、即ち、賦形剤、安定剤等の添加剤とともに含む製剤とすることが好ましい。

燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの塩は水溶性であるため、注射剤として用いる場合に最適である。該医薬製剤において、前記有効成分の担体成分に対する割合は、1～90重量%の間で変動せう。

剤形及び投与形態としては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤もしくは液剤等の剤形にして、又は原末のまま経口投与してもよいし、注射剤として静脈内投与、筋肉内投与又は皮下投与してもよい。また、坐剤、軟膏剤、パップ剤、貼付剤、リニメント剤、ローション剤等の剤形にして、外用剤として用いることもできる。また、注射用の粉末にして、用時調製して使用してもよい。

である軟膏剤又はパップ剤等として用いる場合は、0.1～10重量%含有していることが好ましい。

臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し有効成分として、1日量100～2000mgを内服することが好ましいが、年齢、症状により適宜増減することも可能である。前記1日量を1回、又は適当な間隔をおいて2もしくは3回に分けて投与することが好ましい。

また、注射剤として用いる場合には、成人に対し有効成分として、1回量10～1000mgを投与することが好ましく、軟膏剤又はパップ剤等として用いる場合は、前記含有割合のものを適当量患部に塗布することが好ましい。

### 【発明の効果】

本発明品の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩は、細胞接着阻害作用を有し、かつ毒性もないので癌転移抑制剤として有用である。

### 【実施例】

経口、経腸、非経口もしくは局所投与に適した医薬用の有機又は無機の、固体又は液体の担体もしくは希釈剤を、本発明の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を含む医薬製剤を調製するために用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、ガム、ポリアルキレングルコール、石油樹脂、やし油、ラノリン又は医薬に用いられる他のキャリアー（担体）は全て、本発明品の担体として用いることができる。また、安定剤、湿潤剤、乳化剤や、浸透圧を変えたり、製剤の適切なpHを維持するための塩類を補助薬剤として適宜用いることもできる。

顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤又はカプセル剤の場合には、該医薬製剤は本発明品を5～80重量%含有していることが好ましく、液剤の場合には、1～30重量%含有していることが好ましい。また、注射剤の場合は1～10重量%、坐剤の場合は1～50重量%が好ましい。局所投与用

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において、燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンのリン含量、燐脂質又は脂質含量、及びグリコサミノグリカン（GAG）含量は、以下の方法で測定した。

### 測定法

#### 1. GAGの定量

（1）ウロン酸を含有するGAG：カルバゾール硫酸法（Bitter-Muir法）ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 4, 330-334 (1962)

（2）ガラクトースを含有するセラタン硫酸又はセラタンポリ硫酸：アンスロン法 Biochem.J. 50, 298-303 (1952)

#### 2. 燐脂質又は脂質の定量

（1）リンの定量：モリブデンブルー法、無機応用比色分析、4、共立出版株式会社、編集代表 平野四蔵 130～135頁

（2）脂肪酸の定量：10～50mgのGAG-

特開平 4-80201 (11)

脂質を 10 ml の 1 N - 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、100℃で1時間加水分解する。反応液を 1 N - 塩酸水溶液で酸性にした後、クロロホルムで抽出し、クロロホルム相を水で洗浄する。脱水パウ硝で乾燥後、減圧下で溶媒を除去。残渣に 3 % 塩酸 (ガス) 含有メタノールを加え、封管中、100℃で3時間加熱後、石油エーテルで3回抽出する。石油エーテルを3回水洗し、混入した塩酸を除き、脱水パウ硝で乾燥後、減圧濃縮し、次の (GLC) 用試料とする。

気相液相クロマトグラフィー (GLC)

GC-15A (島津製作所)

充填剤: PEG-HT 5 % Uniport HP 60/80

ガスクロ工業機

運転条件: 試料気化室温度 350℃

カラム温度: 190~200℃

カラム: 3φ×2m

流速: N<sub>2</sub> 45 ml/min.

製造例 1

(1) 還元末端限定酸化グリコサミノグリカンの

製造

1) 還元末端残基開環ヒアルロン酸の製造

ヒアルロン酸 (鶏冠由来、MW 1万: HA1)

2000mgを200mlの0.05Mホウ酸塩緩衝液 (pH8.3) に溶解し、182mgの水素化ホウ酸ナトリウムを加えて室温で5時間反応させた。酢酸で pH4.5 にしてエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いで生成物をエタノールで洗浄した。これによりロット番号 100 の還元末端残基開環ヒアルロン酸 (R-HA1) を 1800mg 得た。

2) 還元末端限定酸化ヒアルロン酸の製造

1700mgの R-HA1 (ロット番号 100) を 250ml の 40mM イミダゾール (pH6.5) に溶解し、0℃で 139.96mg の過ヨウ素酸ナトリウムを加え、1時間反応させた。反応液にエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いでエタノールで洗浄した。これによりロット番号 200 の還元末端限定酸化ヒアルロン酸 (O-HA) 1600mg を得た。

3) 他のグリコサミノグリカンの還元末端限定

酸化物 (O-GAG) の製造

ヒアルロン酸 (鶏冠由来、MW 5万: HA5, MW15万: HA15)、

コンドロイチン (コンドロイチン硫酸 A から酸性メタノール溶液で脱硫酸したもの、MW1.5万: CH)、

コンドロイチン硫酸 C (鯨軟骨由来、MW1万: CS(S1)、MW3万: CS(S3)、MW6万: CS(S6))、

コンドロイチン硫酸 A (鯨軟骨由来、MW3万: CS(W))、

デルマタン硫酸 (豚皮由来、MW1.5万: DS)、

ヘパリン (豚小腸由来、MW1.5万: Hep)、

ヘパラン硫酸 (牛腎由来、MW1.5万: HS)、

ケラタン硫酸 (牛角膜由来、MW1.5万: KS)

を原料として上記の 1) に準じて表 2 の条件で還元末端残基開環グリコサミノグリカン (R-GAG) を製造した。ひきつづき、上記の 2) の方法に準じて表 3 の条件で還元末端限定酸化グリコサミノグリカン (O-GAG) を製造した。

表 2

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/NaBH <sub>4</sub> (mg/mg)	収量 (mg)
100-2	R-HA5	5000/94.58	4720
100-3	R-HA15	1000/ 6.31	971
101	R-CH	1000/63.05	867
102	R-CS(S1)	1000/94.58	880
102-2	R-CS(S3)	1000/31.50	897
102-3	R-CS(S6)	1000/15.76	869
103	R-CS(W)	1000/31.50	823
104	R-DS	150/ 9.46	130
105	R-Hep	1000/63.05	772
106	R-HS	40/ 2.55	35
107	R-KS	20/ 1.28	14.6

特開平 4-80201(12)

実施例 1

還元末端ラクトン化による糖脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) 還元末端酸化グリコサミノグリカンの製造

1) 還元末端酸化ヒアルロン酸の製造

500mgのヒアルロン酸(鶏冠由来、MW1万: HA1)を水10mlに溶解し、0.1Mヨウ素のメタノール溶液5mlを加えて室温で6時間反応させた。その後、反応液に0.1N水酸化カリウムを約5ml加えて遊離のヨウ素の色を消失させた。この溶液に酢酸カリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱を濾取し、充分にエタノールで洗浄し、減圧乾燥した。

これによりロット番号400の還元末端酸化ヒアルロン酸423mgを得た。

ソモジーネルソン法による還元糖の有無: 無

2) 還元末端ラクトンヒアルロン酸の製造

400mgのロット番号400の還元末端酸化ヒアルロン酸を水10mlに溶解し、強酸性イオン交

表 3

ロット番号	生成物	反応条件 R-GAG/NaIO <sub>4</sub> (mg/mg)	収量 (mg)
200-2	O-HA5	4500/77.0	4310
200-3	O-HA15	900/ 5.14	815
201	O-CH	800/45.65	766
202	O-CS(S1)	800/68.48	715
202-2	O-CS(S3)	800/22.83	774
202-3	O-CS(S6)	800/11.41	699
203	O-CS(W)	800/22.83	697
204	O-OS	100/ 5.71	82
205	O-Hep	700/39.95	666
206	O-HS	30/ 1.71	22
207	O-KS	10/ 0.57	7

換樹脂(Dowex 50(H<sup>+</sup>))50mlに1時間を要して通過させ、還元末端ラクトンヒアルロン酸390mgを含む水溶液を得た。

ソモジーネルソン法による還元糖の有無: 無

上記の水溶液をトリ-*n*-ブチルアミンで中和し、凍結乾燥して還元末端ラクトンヒアルロン酸のトリ-*n*-ブチルアミン塩(ロット番号500)400mgを得た。

3) 他の還元末端ラクトングリコサミノグリカンの製造方法

コンドロイチン(MW1.5万: CH)、

コンドロイチン硫酸C(MW1万: CS(S1)、MW3万: CS(S3)及びMW6万: CS(S6))、

デルマタン硫酸(MW1.5万: DS)、

ヘパリン(MW1.5万: Hep)、及び

ヘパラン硫酸(MW1.5万: HS)

を原料として、上記1)に準じて表4の条件で還元末端酸化グリコサミノグリカンを製造した。ひきつづき、上記2)に準じて表5の条件で還元末端ラクトングリコサミノグリカンを製造した。

表 4

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/0.1N-1 <sub>2</sub> /0.1N-KOH(mg/ml/ml)	収量 (mg)	ソモジーネルソン
401	CH-COOK	1000/13.4/13.4	823	+
402	CS(S1)-COK	1000/19.8/19.8	901	+
402-2	CS(S3)-COK	1000/ 3.3/ 3.3	895	+
402-3	CS(S6)-COK	1000/4.95/4.95	913	+
404	DS-COOK	100/0.67/0.67	91	+
405	Hep-COOK	1000/6.7/6.7	902	+
406	HS-COOK	100/1.34/1.34	86	+

ソモジーネルソン: ソモジーネルソン法による還元糖の有無(有は+, 無は-で示す)

特開平 4-80201 (13)

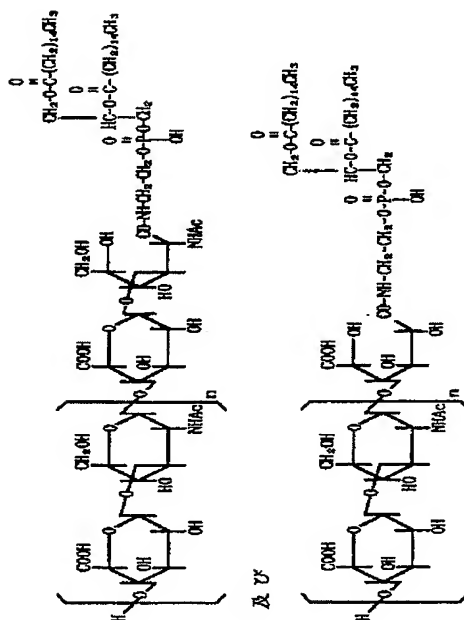
(2) L- (α-ホスファチル) エタノールアミン・ジパルミトイル結合グリコサミノグリカン (GAG-PPEADP) の製造

1) L- (α-ホスファチル) エタノールアミン・ジパルミトイル結合ヒアルロン酸の製造

表 5

ロット番号	生成物	反応条件 GAG-COOK/Dowex50 (H <sup>+</sup> )	取量 (mg)	ソモジー ネルソン
501	CH-ラクトン	800/400	780	—
502	CS (S1)-ラクトン	900/450	805	—
502-2	CS (S3)-ラクトン	800/400	850	—
502-3	CS (S6)-ラクトン	900/450	887	—
504	DS-ラクトン	90/100	96	—
505	Hep-ラクトン	900/400	946	—
506	HIS-ラクトン	80/40	72	—

ソモジーネルソン：ソモジーネルソン法による還元糖の有無（有は+、無は-で示す）



400 mgのロット番号500の還元末端ラクトンヒアルロン酸を200 mlのジメチルホルムアミドに溶解し、27.6 mgのPPEADPのクロロホルム溶液を加えて、70℃で2時間反応させ、クロロホルムを溜去し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてから、酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えた。生じた沈澱をろ取り、0.3 M酢酸アンモニウム溶液に溶解し、疎水クロマトカラム (TSKgelフェニルトヨパール650 M 400 ml) に吸着し、十分に0.3 M塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り及び洗浄画分に未反応のHA1が溶出され、30%メタノール水溶液の画分に目的とする本品が溶出した。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧下濃縮し、透析で脱塩後、凍結乾燥して精製し、ロット番号600の目的物36 mgを得た。

リン含量：0.30%

PPEADP含量：6.44%

ヒアルロン酸含量：82.37%

特開平 4-80201(14)

疎水クロマトグラフ：図-1に示す。

疎水クロマトグラフィの条件

カラム：TSK gel フェニル5PW  
(7.5φ×7.5cm)

溶媒：0～5分 0.3M塩化アンモニウム  
水溶液

5～50分 30%メタノール水溶液

溶出速度：0.5 ml/分

圧：7 kg/0.5cm<sup>2</sup>

分画容量：1 ml/管

検出：OD<sub>220nm</sub>

検体：100μl (1 mg/ml 0.3M塩化アンモニウム水溶液)

2) その他のL-(α-ホスファチル)エタノールアミン・ジバルミトイル結合グリコサミノグリカンの製造

表5に示した還元末端ラクトングリコサミノグリカンとPPEADPとを表6に示した条件で、上記(2)-1)の方法に準じて製造した。得られた生成物の分析値を表7に示した。

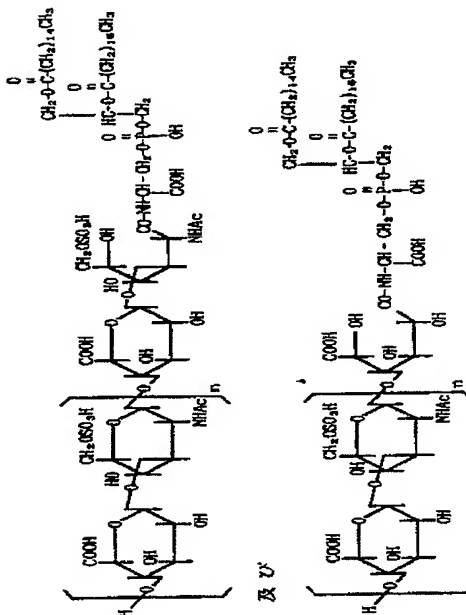
表 6

ロット番号	生成物	反応条件(mg/mg) GAG-ラクトン/PPEADP
601	CH-PPEADP	700/32.3
602	CS(S1)-PPEADP	800/55.4
602-1	CS(S3)-PPEADP	400/9.26
602-3	CS(S6)-PPEADP	800/9.00
604	DS-PPEADP	90/4.15
605	Hep-PPEADP	800/36.91
606	HS-PPEADP	70/3.31

表 7

ロット番号	生成物	収量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
601	CH-PPEADP	70.2	4.30	90.90
602	CS(S1)-PPEADP	88.0	6.41	85.17
602-1	CS(S3)-PPEADP	20	2.01	89.70
602-3	CS(S6)-PPEADP	56.2	1.08	92.00
604	DS-PPEADP	4.5	4.00	90.66
605	Hep-PPEADP	24	4.11	90.01
606	HS-PPEADP	5.74	4.22	88.21

(3) ホスファチルセリンステアロイル結合コンドロイチン硫酸Cの製造



400mgのロット番号500-2の還元末端ラクトンコンドロイチン硫酸Cを200mlのジメチルホルムアミドに溶解し、9mgのホスファチルセリンステアレートパルミテートのクロロホルム溶液を加えて、70℃で2時間反応させた。クロロホルムを溜去し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてから、酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱を濾取した。沈澱を0.3M塩化アンモニウム溶液で溶解し、実施例1-(2)-1)に準じて処理した。これによりロット番号700-2のホスファチルセリンステアロイルパルミトイル結合コンドロイチン硫酸Cを20.8mg得た。

リン含量：0.10%

コンドロイチン硫酸C含量：86.15%

疎水クロマトグラフ：図-2に示す。

測定条件は前記と同じ。

実施例 2

還元末端アミン法による燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造

特開平4-80201(15)

(1) 還元末端アミノグルコサミノグリカンの製造

1) 還元末端アミノコンドロイチン硫酸C (CS(S3)) の製造

100mgのロット番号202-2の還元末端残基開環コンドロイチン硫酸Cを50mlの0.05Mリン酸塩緩衝液(pH7.0)に溶解し、24mgのエチレンジアミン塩酸塩を加えて50℃で30分反応させた。その後、20mgのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを加えて50℃で2時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱を濾取した。沈澱を水に溶解し、透析により脱塩し、50mlのDEAE-イオン交換樹脂に吸着させ、0.1M食塩水溶液から1M食塩水溶液のグラジエントで溶出した。0.4M食塩濃度で還元末端アミノコンドロイチン硫酸Cが溶出され、遊離のコンドロイチン硫酸Cは0.75M食塩濃度で溶出した。0.4M食塩溶液画分を透析により脱塩し、凍結乾燥し、ロット番号802-2の還元末端アミノ

コンドロイチン硫酸C80mgを得た。

2) 還元末端アミノヘパリン(Hep)の製造

上記の方法に準じて、100mgのロット番号205還元末端限定酸化ヘパリンを使用し、ロット番号805の還元末端アミノヘパリン77mgを得た。

(2) 脂質のコハク酸誘導体の製造

1) グリセロールモノステアレートのコハク酸エステル8の製造

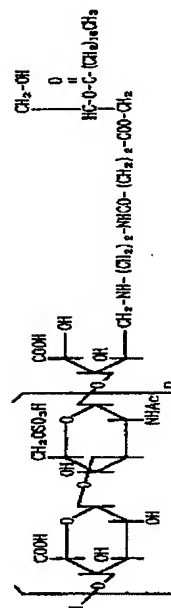
10.74gのグリセロールモノステアレートを3mlのピリジンを含む200mlのベンゼンに溶解し、6gの無水コハク酸を加えて6時間還流した。反応液を減圧濃縮し、生じた沈澱をアセトンで再結晶し、グリセロールモノステアレートのコハク酸エステル8.2gを得た。

2) グリセロールモノステアレートのコハク酸エステルをN-ヒドロキシコハク酸イミドによる活性エステルの製造

上記1)のエステル8gをベンゼンに溶解して、2gのN-ヒドロキシコハク酸イミドを加え、

10gのジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて室温で20時間反応させた。反応液を減圧濃縮して、沈澱をベンゼン/n-ヘキサンで再結晶し、ロット番号GMS-1の標記活性エステル7.4gを得た。

(3) グリセロールモノステアレート結合コンドロイチン硫酸Cの製造



0.9平均60



特開平 4-80201 (16)

80 mg のロット番号 802-2 の還元末端アミノコンドロイチン硫酸 C を 5 ml の水に溶解し、6.95 mg のロット番号 GMS-1 の活性エステルのジメチルホルムアミド溶液を加えて室温で 20 時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加え、生じた沈澱を濾取した。沈澱を 0.3 M 塩化アンモニウム水溶液に溶解し、実施例 1-(2)-1) に準じて精製し、ロット番号 902-2 の標記目的物 38 mg を得た。

ステアリン酸含量：0.86%

コンドロイチン硫酸 C 含量：98.2%

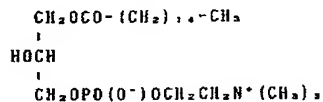
疎水クロマトグラフ：図-2 に示す。

測定条件は前記と同じ。

(4) 燐脂質のコハク酸誘導体の製造

1) リゾレシチンのコハク酸エステルの製造

次式のリゾレシチン



495 mg をクロロホルム 200 ml に溶解し、無水

コハク酸 100 mg と 79 mg のピリジンを加えて室温で 20 時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、生じた沈澱をアセトンで再結晶し、リゾレシチンのコハク酸エステルを得た。

2) リゾレシチンのコハク酸エステルの N-ヒドロキシコハク酸イミドによる活性エステルの製造

上記エステル 288.5 mg をジメチルホルムアミドに溶解し、57.5 mg の N-ヒドロキシコハク酸イミドと 103 mg のジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて室温で 20 時間反応させた。沈澱を除去し、上記活性エステルのジメチルホルムアミド溶液を得た。

(5) リゾレシチン結合グリコサミノグリカンの製造

1) リゾレシチン結合コンドロイチン硫酸 C の製造

上記 (4)-2) で得られた上記活性化エステルのジメチルホルムアミド溶液にロット番号 802-2 の還元末端アミノコンドロイチン硫酸 C 1 g の水溶液を加えて室温で 20 時間反応させた。精製は実施例 1 に準じて、疎水クロマトグラフィーで精製した。

収量：0.52 g

リン含量：0.105%

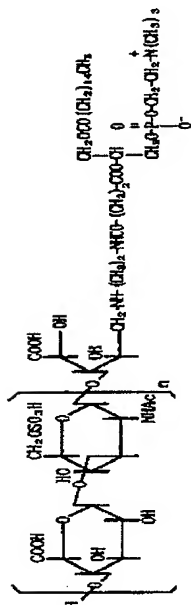
リゾレシチン含量：1.96%

コンドロイチン硫酸含量：98.04%

イオウ含量：5.78%

(6) グルセロールジステアレート結合コンドロイチン硫酸 C の製造

上記 (1)-1) で得られたロット番号 802-2 の還元末端アミノコンドロイチン硫酸 C と上記 (2)-2) と同様な方法で得られたグリセロールジステアレートのコハク酸エステルの活性エステル (ロット番号 GDS-2) とを、上記 (3) に準じて反応させ、精製して、ロット番号 904 の標記化合物 27 mg を得た。

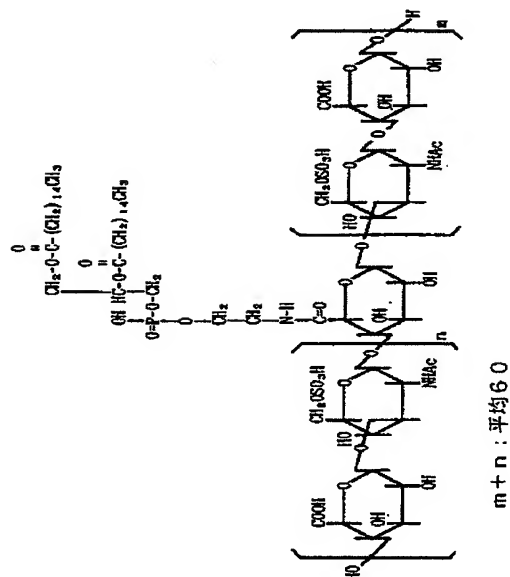


n: 平均60

## 実施例 3

縮合剤使用法による燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) L-( $\alpha$ -ホスファチジル) エタノールアミン・ジパルミトイル結合コンドロイチン硫酸 C の製造



400 mg のコンドロイチン硫酸 C (CS(S3)) のトリ-*n*-ブチルアミン塩を 100 ml のジメチルホルムアミドに溶解し、6.92 mg の PPEADP のクロロホルム溶液を加えた。更に、38.4 mg の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を加えて室温で 20 時間反応させた。反応液を減圧下で濃縮し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にした。この水溶液にエタノールを加えて生じた沈澱を濾取した。沈澱を 0.3 M 塩化アンモニウム水溶液に溶解し、実施例 1-(2)-1) に準じて精製し、ロット番号 1002-2 の標記目的物を 63 mg 得た。

リン含量：0.099%

PPEADP 含量：2.25%

コンドロイチン硫酸 C 含量：96.61%

疎水クロマトグラフィ：図-3 に示す

測定条件は前記と同じ

(2) 他の L-( $\alpha$ -ホスファチジル) エタノールアミン・ジパルミトイル結合グリコサミノグリカンの製造

カン (GAG-PPEADP) の製造

各種のグリコサミノグリカンと PPEADP とを表 8 に示した条件で上記 (1) の方法に準じて燐脂質結合グリコサミノグリカンを製造した。得られた生成物の分析値を表 9 に示した。

特開平 4-80201 (18)

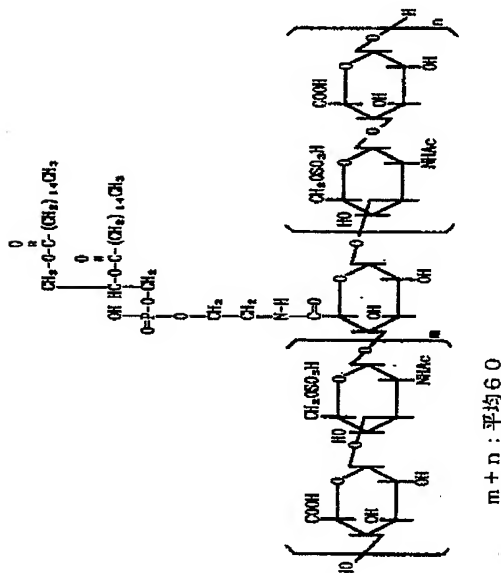
表 8

ロット番号	生成物	反応条件 (mg/mg/mg) GAG*/PPEADP/WSC
1000	HA1-PPEADP	420/20.76/103
1001	CH-PPEADP	420/13.84/68.8
1002-1	CS(S1)-PPEADP	400/20.76/103
1002-3	CS(S6)-PPEADP	400/3.46/17.2
1003	CS(N)-PPEADP	400/6.92/34.3
1004	DS-PPEADP	40/1.38/6.88
1005	Hep-PPEADP	400/13.8/68.8
1006	HS-PPEADP	13/0.46/2.3

\*1: トリー-n-ブチルアミン塩

表 9

ロット番号	生成物	収量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
1000	HA1-PPEADP	28	6.21	90.05
1001	CH-PPEADP	25.8	4.01	88.64
1002-1	CS(S1)-PPEADP	51.9	5.28	92.40
1002-3	CS(S6)-PPEADP	42.2	1.04	97.81
1003	CS(N)-PPEADP	41.9	2.17	96.62
1004	DS-PPEADP	29	4.41	89.12
1005	Hep-PPEADP	101.3	4.04	90.03
1006	HS-PPEADP	1.2	4.00	88.22



実施例 4

グリコサミノグリカン活性化法による磷脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) L-(α-ホスファチル) エタノールアミン・ジバルミトイル結合コンドロイチン硫酸 C の製造

400 mg のコンドロイチン硫酸 C (CS(S3)) のトリー-n-ブチルアミン塩を 300 ml の DMF に溶解し、9.9 mg の N-ヒドロキシスクシンイミドと 20.5 mg のジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて室温で 20 時間反応させた。反応液に過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてからにエタノールを加えて生じた沈澱を濾取した。即座に 30 ml の水で溶解し、6.92 mg の PPEADP のクロホルム溶液を加えて、更にジメチルホルムアミドを加えて均一な溶液とした。室温で 6 時間反応させ、反応液を減圧濃縮して、酢酸飽和のエタノールを加えた。生じた沈澱を 0.3 M 酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、実施例 1-(2)-1) に準じて精製し、ロット番号 1102-2 の標記の目的物を 29.7 mg 得た。

リン含量: 0.100%

PPEADP 含量: 2.16%

コンドロイチン硫酸 C 含量: 95.98%

疎水クロマトグラフィ: 図-4 に示す

## 特開平4-80201(19)

測定条件は前記と同じ

(2) L- (α-ホスファチル) エタノールアミン・ジバルミトイル結合コンドロイチンポリ硫酸の製造

1 g のコンドロイチンポリ硫酸 (CSP(II)) のトリ-n-ブチルアミン塩 (イオウ含量 13.0%、分子量 10000) を 50 ml のジメチルホルムアミドに溶解し、1770 mg の N-ヒドロキシスクシンイミドと 318 mg のジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて 4℃ で一晩反応させた。反応液に 10 ml の水を加えて室温で 15 分間反応させ、生じた沈澱を除去した後、この溶液に 69.2 mg のホスファチルエタノールアミン・ジバルミトイル (PPEADP) のクロロホルム溶液を加えて室温で 6 時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、酢酸ナトリウム飽和のエタノールを加えて生じた沈澱を集めた。沈澱を 0.3 M の酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、実施例 1-(2)-1) に準じて精製し、ロット番号 1108 の標記の目的物 67 mg を得た。

リン含量: 0.291%

PPEADP 含量: 6.5%

コンドロイチンポリ硫酸含量: 92.8%

イオウ含量: 12.05%

疎水クロマトグラフィ: 図-5 に示す

測定条件は前記と同じ

### 参考例 1

フィブロネクチンをつめ塗布した培養皿に塗布した燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの BHK 21 細胞の接着に対する効果

96 穴培養皿を 5 μg/ml ウシ血漿フィブロネクチン 100 μl で塗布した後、洗浄し、実施例 1~4 で得た各種燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン 100 μl/穴を表 10 に示す各濃度で塗布した。

別に、100 mm 径の培養皿に培養した BHK 21 細胞 (新生ハムスター腎細胞) を 0.1 mg/ml の濃度のトリブシン溶液 5 ml を加え、37℃ で 5 分間処理した。次いで、1 mg/ml の大豆トリブシンインヒビター溶液 5 ml を加え、トリブシンを

不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。細胞は 2 回洗浄後、1 ml あたり  $1 \times 10^4$  個細胞となるように単一細胞懸濁液とした。

得られた単一細胞懸濁液 100 μl ( $1 \times 10^4$  個細胞) を、上記フィブロネクチンと燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した培養皿に加え、37℃ で 1 時間処理した。接着しなかった細胞を洗浄した後、接着した細胞を 2% ホルムアルデヒドで固定し、直接位相差顕微鏡で観察し、その細胞数をカウントした。

結果を表 10 に示す。表 10 は、各濃度における細胞接着の変動を示す。値は 3 回ないし 4 回の測定の前平均を示し、誤差 (標準偏差) もあわせて表した。

なおそれぞれの遊離グリコサミノグリカンおよび未結合の脂質のみでは高濃度にしても全く細胞接着阻害効果を示さなかった。

表 10

ロット番号 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	600 (HA1-PPEADP)	601 (CA-PPEADP)	602 (CS(S1)-PPEADP)	602-2 (CS(S3)-PPEADP)
0.1				98.7 $\pm$ 0.9%
0.2				82.4 $\pm$ 3.8%
0.5				49.8 $\pm$ 4.6%
1				44.7 $\pm$ 6.8%
2				35.4 $\pm$ 9.5%
5	73.5 $\pm$ 1.3%	85.0 $\pm$ 2.6%	87.4 $\pm$ 8.6%	35.4 $\pm$ 9.5%
10	72.5 $\pm$ 8.6%	80.3 $\pm$ 6.9%	83.1 $\pm$ 15.3%	49.8 $\pm$ 4.6%
20	29.9 $\pm$ 2.6%	63.8 $\pm$ 2.7%	50.2 $\pm$ 5.2%	44.7 $\pm$ 6.8%
50	3.8 $\pm$ 0.5%	65.5 $\pm$ 10.0%	33.5 $\pm$ 6.5%	35.4 $\pm$ 9.5%
100	0.8 $\pm$ 0.1%	44.4 $\pm$ 4.2%	24.4 $\pm$ 2.4%	4.3 $\pm$ 1.3%
200	0.3 $\pm$ 0.2%	33.8 $\pm$ 3.8%	3.2 $\pm$ 1.1%	0.7 $\pm$ 0.1%

ロット番号 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	602-3 (CS(S6)-PPEADP)	604 (DS-PPEADP)	605 (lep-PPEADP)	606 (HS-PPEADP)
0.1	98.9 $\pm$ 0.9%	85.8 $\pm$ 4.5%		
0.2	89.3 $\pm$ 0.5%	80.2 $\pm$ 3.6%		
0.5	85.0 $\pm$ 1.1%	-		
1	40.0 $\pm$ 3.6%	-		
2	12.7 $\pm$ 1.0%	-	86.7 $\pm$ 1.3%	14.9 $\pm$ 0.8%
5	1.5 $\pm$ 0.7%	14.9 $\pm$ 2.0%	76.1 $\pm$ 5.4%	5.7 $\pm$ 0.5%
10	1.3 $\pm$ 0.5%	6.7 $\pm$ 1.2%	60.5 $\pm$ 6.9%	2.0 $\pm$ 0.3%
20	0.0 $\pm$ 0.0%	2.4 $\pm$ 0.9%	44.0 $\pm$ 5.0%	1.3 $\pm$ 0.4%
50		0.9 $\pm$ 0.6%	46.0 $\pm$ 7.5%	1.0 $\pm$ 0.1%
100			17.3 $\pm$ 3.4%	0.9 $\pm$ 0.0%
200			11.6 $\pm$ 2.2%	

ロット番号 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1000 (HA1-PPEADP)	1002-2 (CS(S3)-PPEADP)	1004 (DS-PPEADP)	1005 (lep-PPEADP)
0.1				
0.2				
0.5				
1				
2				
5				
10		88.3 $\pm$ 16.6%	99.3 $\pm$ 7.8%	
20		57.8 $\pm$ 4.8%	89.9 $\pm$ 0.4%	
50		19.6 $\pm$ 4.4%	75.6 $\pm$ 4.9%	
100	95.6 $\pm$ 4.8%	7.5 $\pm$ 3.7%	55.0 $\pm$ 5.7%	95.3 $\pm$ 0.9%
200	80.5 $\pm$ 5.4%		56.2 $\pm$ 1.1%	75.0 $\pm$ 12.1%
	73.5 $\pm$ 0.6%		43.7 $\pm$ 4.9%	55.5 $\pm$ 1.1%
	55.0 $\pm$ 0.3%			45.1 $\pm$ 1.0%

## 参考例 2

各種培養細胞の細胞接着物質に対する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの接着阻害効果

実施例 1～4 で得た燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンについて、BHK 21 細胞（新生ハムスター腎細胞）、CEF（ニワトリ胚神経芽細胞）、B16F10（高転移性マウスメラノーマ細胞）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、及び b a E C（ウシ大動脈内皮細胞）の各種細胞群に対しての、フィブロネクチン（FN）、ラミニン（LN）、I 型コラーゲン（Col1）及びビトロネクチン（VN）による接着に対する阻害効果を検討した。

各  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  のウシ血漿フィブロネクチン、マウス EHS 腫瘍細胞由来ラミニン、ラット胚由来 I 型コラーゲン、及びウシ血清ビトロネクチンをそれぞれ 96 穴培養皿に塗布し、参考例 1 と同様にして、実施例 1～4 で得た燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した後、それぞれ BHK 21 細胞、CEF 細胞、B16F10 細胞、CHO 細胞、及び b a E C 細胞の単一細胞懸

濁液  $100 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  個細胞) を加入細胞接着の変動を見た。対照として燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを添加せず、接着物質のみの細胞接着を 100% とした。結果を表 11 に示す。

なお、表 11 中で相対接着細胞数として、全くあるいは殆ど細胞接着しなかった場合 (0～10% 未満) を -、10～30% 未満を +、30～50% 未満を ++、50～70% 未満を +++、70～90% 未満を ++++、そして 90～100% の細胞が接着した場合を +++++ と半定量的に表した。

2) 他の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの細胞接着阻害の結果

表 11

ロット番号	用量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	細胞/接着物質 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )							
		BHK21		CEF		B16F10		CHO	
		FN	VN	FN	VN	FN	VN	FN	VN
600 (HA1-PPEADP)	10	+++							
	100								
601 (CH-PPEADP)	10	+++				+++			
	100	+				+			
602 (CS (S1)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
602-2 (CS (S3)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
702-2 (CS (S3)-P-S)	10	-				-			
	100	-				-			
602-3 (CS (S6)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
604 (DS-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
605 (Hep-PPEADP)	10	+++				++			
	100	+				+			
606 (HS-PPEADP)	10	+				+			
	100	-				-			
902-2 (CS (S3)-GMS)	10	++++							
	100	+++							
904 (CS (S3)-GMS)	10	+++							
	100	+							
1000 (HA1-PPEADP)	10	++++							
	100	++++							
1001 (CH-PPEADP)	10	++++				+++			
	100	+++				+++			
1002 (CS (S1)-PPEADP)	10	+++				+			
	100	++				-			
1002-2 (CS (S3)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
1002-3 (CS (S6)-PPEADP)	10	++				++			
	100	+				+			
1003 (CS (S6)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
1004 (DS-PPEADP)	10	+++							
	100	++							
1005 (Hep-PPEADP)	10	++++							
	100	+++							
1006 (HS-PPEADP)	10	++							
	100	-							
1008 (CPS (II)-PPEADP)	10	+++				+++			
	100	+				+			

ロット番号	用量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	細胞/接着物質 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )							
		BHK21		CEF		B16F10		CHO	
		FN	VN	FN	VN	FN	VN	FN	VN
HA1	100	++++		++++		++++		++++	
HA5	100	++++		++++		++++		++++	
HA15	100	++++		++++		++++		++++	
CH	100	++++		++++		++++		++++	
CS (S1)	100	++++		++++		++++		++++	
CS (S3)	100	++++		++++		++++		++++	
CS (S6)	100	++++		++++		++++		++++	
CS (S6)	100	++++		++++		++++		++++	
DS	100	++++		++++		++++		++++	
Hep	100	++++		++++		++++		++++	
HS	100	++++		++++		++++		++++	
CPS (II)	100	++++		++++		++++		++++	
PPEADP	100	++++		++++		++++		++++	

ロット番号	用量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	細胞/接着物質 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
		baEC	
		F N	Coll
600 (HA1-PPEADP)	10	+	++
	100	-	-
601 (CH-PPEADP)	10	++++	++++
	100	++	++
602 (CS (S1)-PPEADP)	10	-	+
	100	-	-
602-2 (CS (S3)-PPEADP)	10	-	-
	100	-	-
602-3 (CS (S6)-PPEADP)	10	-	-
	100	-	-
604 (DS-PPEADP)	10	-	++
	100	-	-
605 (Hep-PPEADP)	10	++	+++
	100	+	++
606 (HS-PPEADP)	10	++	++
	100	-	-
HA1	100	++++	++++
CH	100	++++	++++
CS (S1)	100	++++	++++
CS (S3)	100	++++	++++
CS (S6)	100	++++	++++
DS	100	++++	++++
Hep	100	++++	++++
HS	100	++++	++++
PPEADP	100	++++	++++

特開平 4-80201 (22)

参考例 3

血管内皮培養細胞の細胞外マトリックスにおける高転移性癌細胞の接着に対する燐脂質結合コンドロイチン硫酸 C の抑制効果

マウス由来血管皮細胞を 24 穴の I 型コラーゲンでコートした培養皿で集密状態になるまで培養し、細胞単層に 0.5% トリトン X-100 で室温 30 分間処理し、破壊された細胞片をダルベッコの緩衝液 (Dulbecco's PBS (+)) で洗浄して内皮細胞の細胞外マトリックスを得た。

一方、100mm 径の培養皿に培養したマウス由来高転移性癌細胞 B16F10 に 5ml トリプシン溶液 (0.1mg/ml PBS (-)) を加え、37℃ で 5 分間処理した。次いで、大豆トリプシン阻害剤 5ml (1mg/ml) を加え、トリプシンを不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。さらに細胞をリン酸塩緩衝液 (PBS (-)) で 2 回洗浄後、1ml あたり  $2 \times 10^6$  個の細胞数になるように単一細胞懸濁液 (Hanks' BSS-20mM HEPES, pH 7.4) を調製した。

ロット番号 602-2 (CS(S3)-PPEADP) の燐脂質結合コンドロイチン硫酸 C と、B16F10 の単一細胞懸濁液 500μl ( $1 \times 10^6$  個細胞を、前述した細胞外マトリックスを調製した 24 穴培養皿に加え、37℃ で 1 時間、5% 炭酸ガス培養器内で静置した。

上清を静かに集め、さらにハンクス緩衝液で 1 回穏やかに洗った。その上清と洗液を合わせて、細胞外マトリックスに接着しなかった細胞としてその細胞数をコールターカウンター (コールター・エレクトロニクス社製) で計数した。対照としてロット番号 602-2 (CS(S3)-PPEADP) を含まない緩衝液のみのもの (無添加) と、遊離のコンドロイチン硫酸 C を添加したものを比較した。

細胞の接着率は、最初に添加した全細胞数から計数した非接着細胞数を引き、その値を全細胞数で割った値を百分率で表した。その結果を表 12 に示す。

表 12

サンプル	添加量 (μg)	接着率 (%)
無添加	-	82.8%
遊離コンドロイチン硫酸 C	50μg	82.6%
602-2 (CS(S3)-PPEADP)	50μg	50.7%

この結果から、本発明の燐脂質結合グリコサミノグリカンは血管内皮細胞の細胞外マトリックスに対する高転移性癌細胞の接着を抑制することがわかる。遊離のコンドロイチン硫酸 C ではそのような作用は全く認められなかった。

4. 図面の簡単な説明

図 1～5 は、燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの疎水クロマトグラフィーを示し、図 1 は実施例 1-(2)-1) の目的物、図 2 は実施例 1-(3) の目的物、図 3 は実施例 3-(1) の目的物、図 4 は実施例 4-(1) の目的物、図 5 は実施例 4-(2) の目的物である。

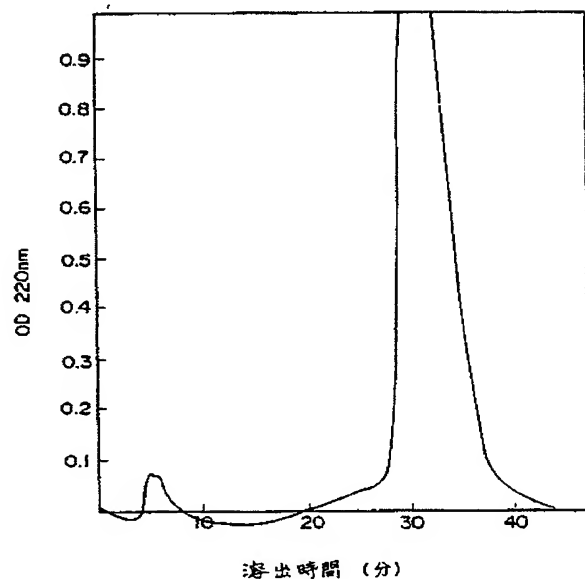


図 1

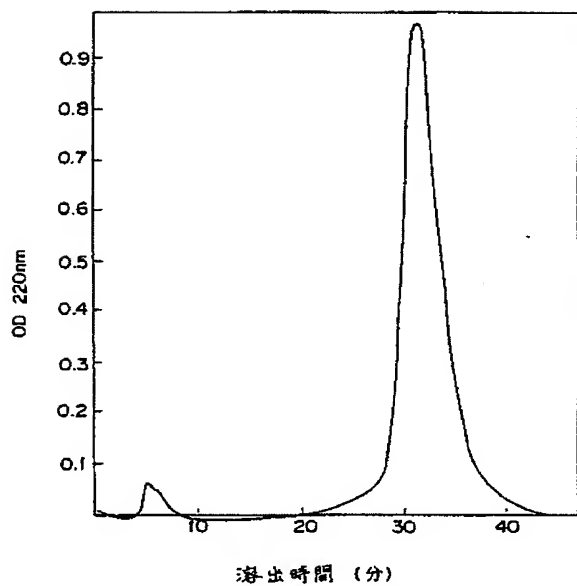


図 2

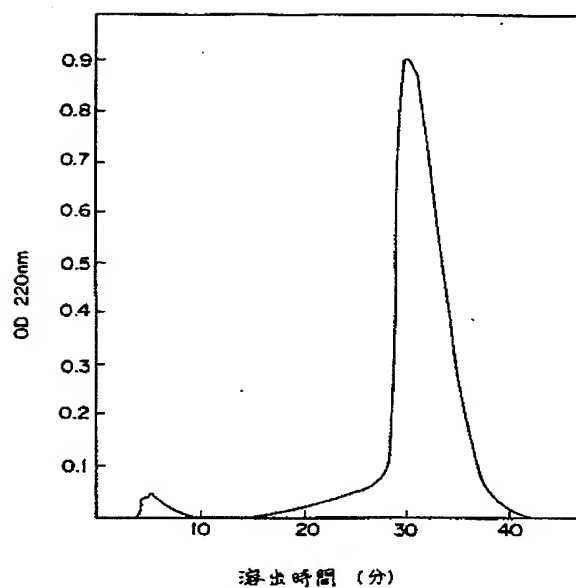


図 3

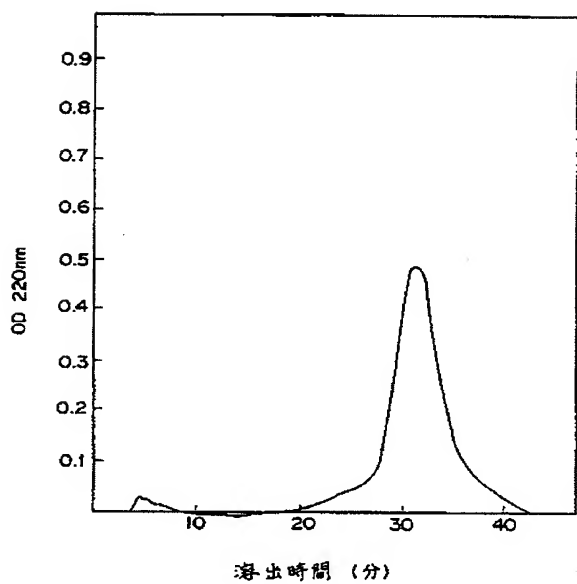


図 4

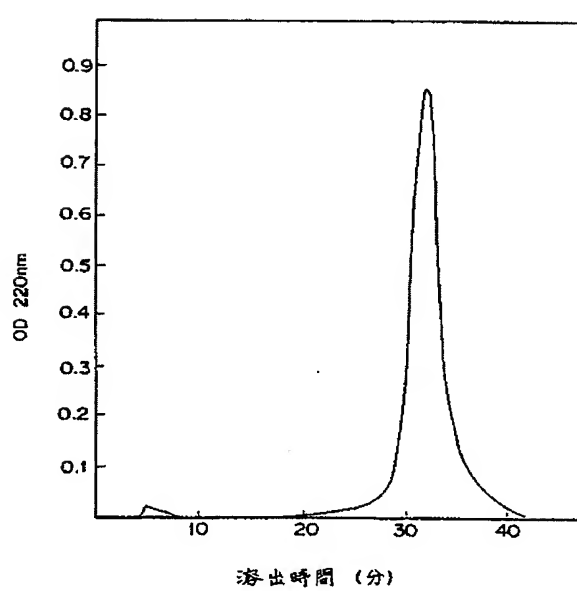


図 5



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>

C 08 B 37/00  
37/10

識別記号

H

庁内整理番号

7624-4C  
7624-4C

手続補正書

平成 3 年 7 月 23 日

特許庁長官 横 沢 亘 殿

1. 事件の表示

平成 2 年特許願第 193817 号

2. 発明の名称

糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 生化学工業株式会社

4. 代理人

住 所 〒107 東京都港区赤坂 2-10-8 第一信和ビル

氏 名 弁護士 (7866) 横 国 隆  
電話 (3586) 1738~2

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲及び発明の詳細な説明の各欄

7. 補正の内容

I. 特許請求の範囲の欄

別紙 1 のとおり訂正する。

II. 発明の詳細な説明の欄

(1) 明細書 8 頁表 1 のコンドロイチン硫酸 D のヘキシサミンの欄の「Ga l N A c (4 S)」を「Ga l N A c (6 S)」と訂正する。

(2) 同 8 頁下から 7 行の「D-グルコサミン N-アセチル」を「N-アセチル D-グルコサミン」と訂正する。

(3) 同 8 頁下から 6 行の「D-ガラクトサミン N-アセチル」を「N-アセチル D-ガラクトサミン」と訂正する。

(4) 同 8 頁末行の「o-硫酸」を「O-硫酸」と訂正する。

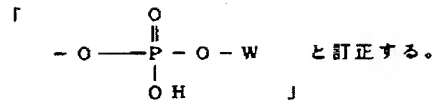
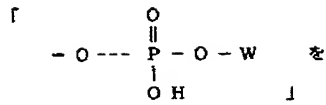
(5) 同 9 頁 9 行~13 頁 3 行を別紙 2 のとおり訂正する。

(6) 同 14 頁 6 行及び 7 行の式 (IX) 及び式 (X) 中の

方式 ⑤  
審 査



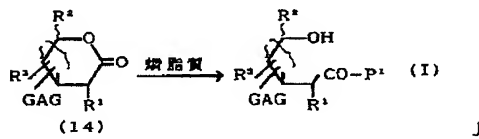
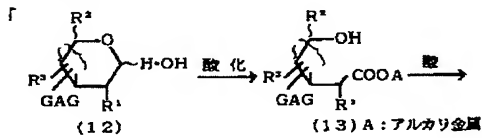
特開平 4-80201 (25)



を挿入する。

「上記還元末端ラクトン化法で製造される化合物を表 A に具体的に示す。」

(7) 同 16 頁 1 ～ 2 行の反応式を次のとおり訂正する。

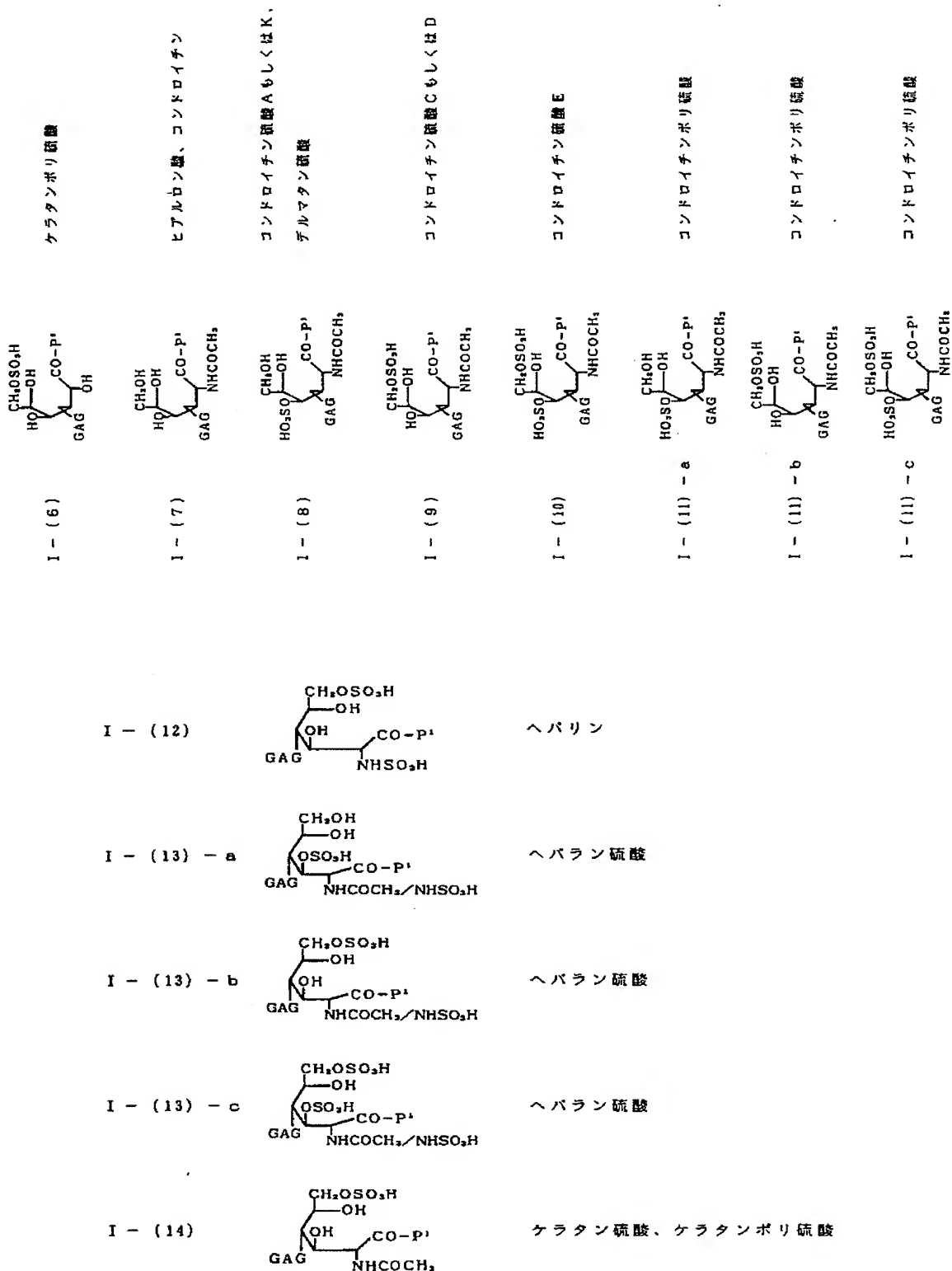


(8) 同 16 頁末行の「ヘパラン、」を「ヘパリン、」と訂正する。

(9) 同 18 頁下から 4 行と 5 行の間に次の記載

表 A

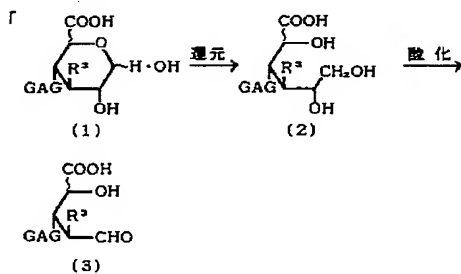
化合物 番号	構造式	原料グリコサミノグリカン (GAG)
I - (1)	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{OH}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array}$	ヒアルロン酸、コンドロイチン、 コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘ パラン硫酸
I - (2)	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{OH}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array} \text{OSO}_3\text{H}$	コンドロイチン硫酸 D、ヘパリン、 ヘパラン硫酸
I - (3)	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{OH}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array}$	コンドロイチン硫酸 K
I - (4) - a	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{OH}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array} \text{OSO}_3\text{H}$	コンドロイチンポリ硫酸
I - (4) - b	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{OH}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array}$	コンドロイチンポリ硫酸
I - (4) - c	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{OH}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array} \text{OSO}_3\text{H}$	コンドロイチンポリ硫酸
I - (5)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CO-P}^1 \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{GAG} \end{array}$	ケラタン硫酸



特開平 4-80201 (27)

(10) 同 18 頁下から 1 ～ 2 行の「式 (3) ……  
…ラクトン」を「式 (3)、(6)、(9) 及  
び (10) のアルデヒド化合物並びに式 (14) の  
ラクトン化合物」と訂正する。

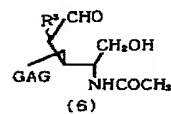
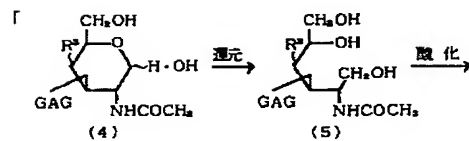
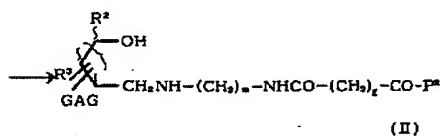
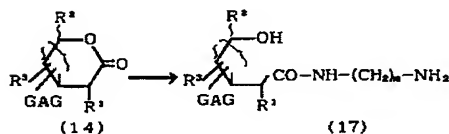
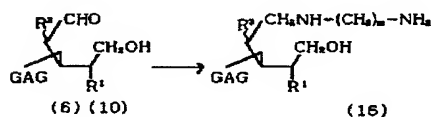
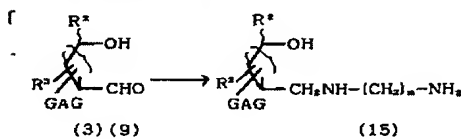
(11) 同 20 頁 1 行～ 2 行の反応式を次のとおり  
訂正する。



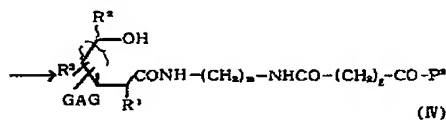
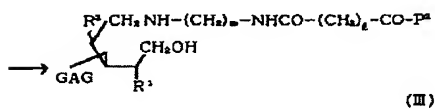
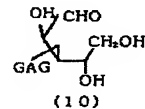
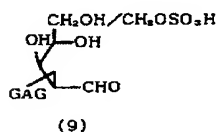
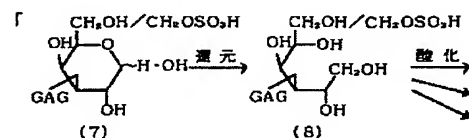
(12) 同 20 頁 2 行と 3 行の間に次の記載を挿入  
する。「(R<sup>3</sup> は前述と同じ)」

(13) 同 21 頁 1 ～ 2 行の反応式を次のとおり訂  
正する。

(15) 同 24 頁 5 行～同 25 頁 3 行の反応式を次  
のとおり訂正する。



(14) 同 22 頁 1 ～ 2 行の反応式を次のとおり訂  
正する。



(16) 同 29 頁 7 行の「燐脂質」を「燐脂質又は  
脂質」と訂正する。

(17) 同 29 頁下から 5 行と 6 行の間に次の記載  
を挿入する。

「上記還元末端アミン法で製造される化合物  
を表 B に具体的に示す。

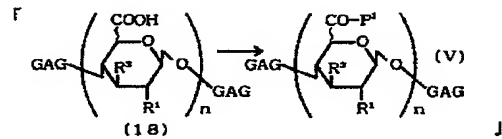
表 B

(R=NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -NHCO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-Ph)			
化合物番号	構造式	原料グリコサミノグリカン (GAG)	
IV-(1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸	
IV-(2)		コンドロイチン硫酸 D、ヘパリン、ヘパラン硫酸	
IV-(3)		コンドロイチン硫酸 K	
IV-(4)-a		コンドロイチンポリ硫酸	
IV-(4)-b		コンドロイチンポリ硫酸	
IV-(4)-c		コンドロイチンポリ硫酸	
IV-(5)		ケラタン硫酸	
IV-(6)		ケラタンポリ硫酸	
II-(1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸	
II-(2)		コンドロイチン硫酸 K、コンドロイチンポリ硫酸	
II-(3)		ケラタン硫酸	
II-(4)		ケラタンポリ硫酸	
III-(1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン	
III-(2)		コンドロイチン硫酸 A もしくは K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸	
III-(3)		ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸	

特開平 4-80201 (26)

IV - (13) - a		ヘパラン硫酸
IV - (13) - b		ヘパラン硫酸
IV - (13) - c		ヘパラン硫酸
IV - (14)		ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸
IV - (7)		ヒアルロン酸、コンドロイチン
IV - (8)		コンドロイチン硫酸 A もしくは K、 デルマトン硫酸
IV - (9)		コンドロイチン硫酸 C もしくは D
IV - (10)		コンドロイチン硫酸 E
IV - (11) - a		コンドロイチンポリ硫酸
IV - (11) - b		コンドロイチンポリ硫酸
IV - (11) - c		コンドロイチンポリ硫酸
IV - (12)		ヘパリン

(18) 同 30 頁 6 行の反応式を次のとおり訂正する。



(19) 同 30 頁 7 行の「R<sup>2</sup> 及び」を「R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及び」と訂正する。

(20) 同 32 頁 2 行と 3 行の間に次の記載を挿入する。

「上記縮合剤使用法で製造される化合物を表 C に具体的に示す。

表 C

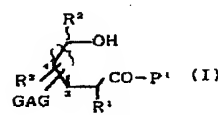
化合物 番号	構造式	原料グリコサミノグリカン (GAG)
V - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E 又はデルマトラン硫酸
V - (2)		コンドロイチン硫酸 D
V - (3)		コンドロイチン硫酸 K
V - (4) - a		コンドロイチンポリ硫酸
V - (4) - b		コンドロイチンポリ硫酸
V - (4) - c		コンドロイチンポリ硫酸
V - (5) - a		ヘパリン、ヘパラン硫酸
V - (5) - b		ヘパリン、ヘパラン硫酸

- (21) 同 34 頁 5 行の「25~60」を「25~60℃」と訂正する。
- (22) 同 52 頁表 6 及び表 7 のロット番号「602-1」を「602-2」と訂正する。
- (23) 同 55 頁 6 行の「残基開環」を「限定酸化」と訂正する。
- (24) 同 59 頁 12~13 行の「疎水クロマト...前記と同じ。」を削除する。

別紙 1

特許請求の範囲

1. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^i$  は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示し、

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマトラン硫酸、ヘパリン、又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマトラン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は OH 基を示し、 $R^3$  は COOH 基を示し、 $R^3$  は OH 基を示す。

特開平 4-80201 (31)

(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 $R^3$ は3位に置換し、 $R^1$ はOSO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^2$ はCOOH基を示し、 $R^3$ はOH基を示す。

(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 $R^3$ は3位に置換し、 $R^1$ はOH基を示し、 $R^2$ はCOOH基を示し、 $R^3$ はOSO<sub>3</sub>H基を示す。

(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 $R^3$ は3位に置換し、 $R^1$ および $R^2$ の少なくとも一つはOSO<sub>3</sub>H基を示し、他はOH基を示し、 $R^3$ はCOOH基を示す。

(5) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガ

ラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ 及び $R^2$ はOH基を示し、 $R^3$ はCH<sub>2</sub>OH基を示す。

(6) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ 及び $R^2$ はOH基を示し、 $R^3$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基を示す。

(7) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OH基を示し、 $R^3$ はOH基を示す。

(8) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OH基

を示し、 $R^3$ はOSO<sub>3</sub>H基を示す。

(9) GAGがコンドロイチン硫酸C又はDから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^3$ はOH基を示す。

(10) GAGがコンドロイチン硫酸Eから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^3$ はOSO<sub>3</sub>H基を示す。

(11) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 $R^3$ は4位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OH基で $R^3$ はOSO<sub>3</sub>H基を示すか、又は $R^2$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基で $R^3$ はOH基もしくはOSO<sub>3</sub>H基を示す。

(12) GAGがヘパリンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 $R^3$ は3位に置換し、 $R^1$ はNH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^3$ はOH基を示す。

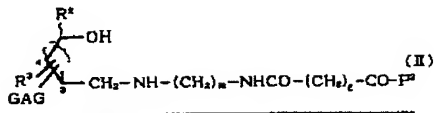
(13) GAGがヘパラン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 $R^3$ は3位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基又はNH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OH基で $R^3$ はOSO<sub>3</sub>H基を示すか、又は $R^2$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基で $R^3$ はOH基もしくはOSO<sub>3</sub>H基を示す。

(14) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 $R^3$ は3位に置換し、 $R^1$ はNHCOCH<sub>3</sub>基を示し、 $R^2$ はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H基を示し、 $R^3$ はOH基を示す。



特開平 4-80201 (32)

2. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^2$  は燐脂質又は脂質を示し、 $m$  は 1~8 を示し、 $l$  は 1~10 を示し、

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマトン硫酸、ヘパリン又はヘパリン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマトン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^2$  は  $\text{COOH}$  基を示し、 $R^3$  は  $\text{OH}$  基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 K 又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸

ン又はその塩。

上記式中、 $m$ 、 $l$  及び  $P^2$  は請求項 2 に記載と同じであり、

(1) GAG がヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 $R^1$  は  $\text{NHCOCH}_3$  基を示し、 $R^2$  は  $\text{OH}$  基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 A もしくは K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマトン硫酸から還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 $R^1$  は  $\text{NHCOCH}_3$  基を示し、 $R^2$  は  $\text{OSO}_3\text{H}$  基を示す。

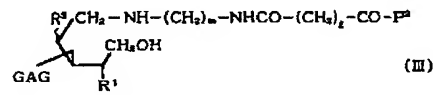
(3) GAG がケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 $R^1$  及び  $R^2$  は  $\text{OH}$  基を示す。

部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^2$  は  $\text{COOH}$  基を示し、 $R^3$  は  $\text{OSO}_3\text{H}$  基を示す。

(3) GAG がケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^2$  は  $\text{CH}_2\text{OH}$  基を示し、 $R^3$  は  $\text{OH}$  基を示す。

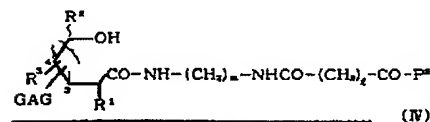
(4) GAG がケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^2$  は  $\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{H}$  基を示し、 $R^3$  は  $\text{OH}$  基を示す。

3. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカ

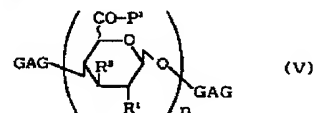
4. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAG、 $R^1$ 、 $R^2$  及び  $P^2$  は請求項 1 に記載と同じであり、 $m$ 、 $l$  及び  $P^2$  は請求項 2 に記載と同じである。

5. 一般式

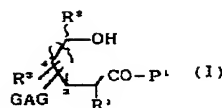


を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^1$  は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示し、 $n$  はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下を示し、

別紙 2

(I) 一般式



を有する磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^1$  は 1 級アミノ基を有する磷脂質を示し、

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマトン硫酸、ヘパリン、又はヘパリン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマトン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^3$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は OH 基を示し、 $R^2$  は COOH 基を示し、 $R^3$  は OH 基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 D から還元性

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、又はデルマトン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  及び  $R^3$  は OH 基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 D のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  は OSO<sub>3</sub>H 基を示し、 $R^3$  は OH 基を示す。

(3) GAG がコンドロイチン硫酸 K のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  は OH 基を示し、 $R^3$  は OSO<sub>3</sub>H 基を示す。

(4) GAG がコンドロイチンポリ硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  及び  $R^3$  の少なくとも 1 つは OSO<sub>3</sub>H 基を示し、他は OH 基を示す。

(5) GAG がヘパリン又はヘパリン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  は OH 基又は OSO<sub>3</sub>H 基を示し、 $R^3$  は OH 基を示す。

末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパリン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^3$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は OSO<sub>3</sub>H 基を示し、 $R^2$  は COOH 基を示し、 $R^3$  は OH 基を示す。

(3) GAG がコンドロイチン硫酸 K から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^3$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は OH 基を示し、 $R^2$  は COOH 基を示し、 $R^3$  は OSO<sub>3</sub>H 基を示す。

(4) GAG がコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^3$  は 3 位に置換し、 $R^1$  および  $R^3$  の少なくとも一つは OSO<sub>3</sub>H 基を示し、他は OH 基を示し、 $R^2$  は COOH 基を示す。

(5) GAG がケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン

残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^3$  は 4 位に置換し、 $R^1$  及び  $R^2$  は OH 基を示し、 $R^3$  は CH<sub>2</sub>OH 基を示す。

(6) GAG がケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^3$  は 4 位に置換し、 $R^1$  及び  $R^2$  は OH 基を示し、 $R^3$  は CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H 基を示す。

(7) GAG がヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^3$  は 4 位に置換し、 $R^1$  は NHCOCH<sub>3</sub> 基を示し、 $R^2$  は CH<sub>2</sub>OH 基を示し、 $R^3$  は OH 基を示す。

(8) GAG がコンドロイチン硫酸 A もしくは K 又はデルマトン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^3$  は 4 位に置換し、 $R^1$  は NHCOCH<sub>3</sub> 基を示し、 $R^2$  は CH<sub>2</sub>OH 基を示し、 $R^3$  は OSO<sub>3</sub>H 基を示す。

特開平 4-80201 (34)

(9) GAG がコンドロイチン硫酸 C 又は D から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$  基を示し、 $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基を示し、 $R^4$  は  $OH$  基を示す。

(10) GAG がコンドロイチン硫酸 E から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$  基を示し、 $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基を示し、 $R^4$  は  $OSO_3H$  基を示す。

(11) GAG がコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$  基を示し、 $R^3$  は  $CH_2OH$  基で  $R^4$  は  $OSO_3H$  基を示すか、又は  $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基で  $R^4$  は  $OH$  基もしくは  $OSO_3H$  基を示す。

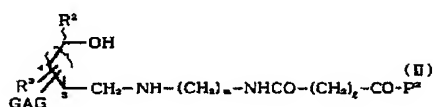
(12) GAG がヘパリンから還元性末端のヘキ

ソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は  $NHSO_3H$  基を示し、 $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基を示し、 $R^4$  は  $OH$  基を示す。

(13) GAG がヘパラン硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$  基又は  $NHSO_3H$  基を示し、 $R^3$  は  $CH_2OH$  基で  $R^4$  は  $OSO_3H$  基を示すか、又は  $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基で  $R^4$  は  $OH$  基もしくは  $OSO_3H$  基を示す。

(14) GAG がケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$  基を示し、 $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基を示し、 $R^4$  は  $OH$  基を示す。

(II) 一般式



を有する磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^*$  は磷脂質又は脂質を示し、 $m$  は 1~8 を示し、 $k$  は 1~10 を示し、

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^3$  は  $COOH$  基を示し、 $R^4$  は  $OH$  基を示す。

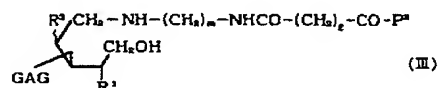
(2) GAG がコンドロイチン硫酸 K 又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸

部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、 $R^2$  は 3 位に置換し、 $R^3$  は  $COOH$  基を示し、 $R^4$  は  $OSO_3H$  基を示す。

(3) GAG がケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^3$  は  $CH_2OH$  基を示し、 $R^4$  は  $OH$  基を示す。

(4) GAG がケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、 $R^2$  は 4 位に置換し、 $R^3$  は  $CH_2OSO_3H$  基を示し、 $R^4$  は  $OH$  基を示す。

(III) 一般式



を有する磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカ

ン又はその塩。

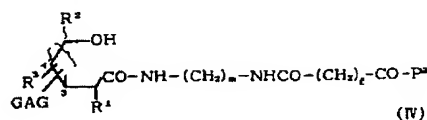
上記式中、 $m$ 、 $l$  及び  $P^2$  は式 (II) に記載と同じであり、

(1) GAG がヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$ 、基を示し、 $R^2$  は  $OH$  基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 A もしくは K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 $R^1$  は  $NHCOCH_3$ 、基を示し、 $R^2$  は  $OSO_3H$  基を示す。

(3) GAG がケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 $R^1$  及び  $R^2$  は  $OH$  基を示す。

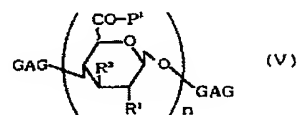
(IV) 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAG、 $R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^3$  は式 (I) に記載と同じであり、 $m$ 、 $l$  及び  $P^2$  は式 (II) に記載と同じである。

(V) 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^1$  は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示し、 $n$  はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下を示し、

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、又はデルマタン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  及び  $R^2$  は  $OH$  基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 D のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  は  $OSO_3H$  基を示し、 $R^2$  は  $OH$  基を示す。

(3) GAG がコンドロイチン硫酸 K のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  は  $OH$  基を示し、 $R^2$  は  $OSO_3H$  基を示す。

(4) GAG がコンドロイチンポリ硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは  $OSO_3H$  基を示し、他は  $OH$  基を示す。

(5) GAG がヘパリン又はヘパラン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 $R^1$  は  $OH$  基又は  $OSO_3H$  基を示し、 $R^2$  は  $OH$  基を示す。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第3部門第3区分  
【発行日】平成11年(1999)2月9日

【公開番号】特開平4-80201  
【公開日】平成4年(1992)3月13日  
【年通号数】公開特許公報4-803  
【出願番号】特願平2-193817  
【国際特許分類第6版】

C08B 37/08  
A61K 31/725  
31/73 ADU  
C08B 37/00  
37/10

【F I】

C08B 37/08 Z  
A61K 31/725  
31/73 ADU  
C08B 37/00 H  
37/10

特 許 補 正 書

平成9年7月24日

特許庁長官 菅井 秀光 殿

1. 事件の表示

平成2年特許第198817号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
名称 生化学工業株式会社

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区有明1丁目2番12号  
S V A X T 8ビル

氏名 弁護士(7866) 隈 田 肇  
TEL(3502)7212



4. 補正対象書類名 明細書

5. 補正対象項目名 特許請求の範囲及び発明の詳細な説明

6. 補正の内容

特許庁

I. 特許請求の範囲の補

別紙1のとおり訂正する。

II. 発明の詳細な説明の補

(1) 平成3年7月23日付け手続補正書のII-(5)の記載を撤回し、明細書9頁7行～13頁3行の記載を別紙2のとおり訂正する。

(2) 明細書15頁5～6行の「脂質、」の後に、次の記載を挿入する。

「例えばモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、エーテル脂質、グリセロールモノステアレート及びグリセロールジステアレートなど、」

(3) 明細書15頁7行「類脂質」の後に、次の記載を挿入する。

「、例えばL-(α-ホスファチル)エタノールアミン、DL-ホスファチル-L-セリン、エタノールアミンプラスマロゲン及びセリンプラスマロゲンなど」

【別添1】

特許請求の範囲

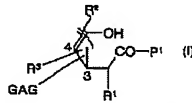
1. グリコサミノグリカンの還元末端に化学的修飾により形成された基又はグリコサミノグリカンのウロン酸残基の官能基と、燐脂質もしくは脂質の官能基又はこれらに導入されたジカルボン酸の官能基との反応生成物である燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

2. グリコサミノグリカンの還元末端に化学的修飾により形成された基がカルボニル基又はアミノ基である、請求項1記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

3. カルボニル基が、グリコサミノグリカンの還元末端を還元して開裂し、部分酸化して得られたアルデヒド基のカルボニル基であるか、グリコサミノグリカンの還元末端を酸化して開裂し、次いで形成されたラク톤のカルボニル基である、請求項2記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

4. アミノ基が、グリコサミノグリカンの還元末端に化学的修飾により形成されたカルボニル基とアルキレンジアミンとの反応により導入されたアミノ基である、請求項2記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

5. 一般式

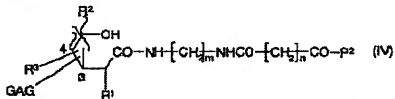


を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^1$  は1級アミノ基を有する燐脂質残基を示し； $GAG$ は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のウロン酸部分又はガラクトース部分を除いたグリコ

リ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し； $R^1$  はOH又は $NHCOCH_3$ を示し； $R^2$  はOH又は $OSO_3H$ を示す。

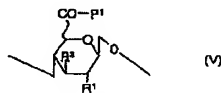
6. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $GAG$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $P^1$ はそれぞれ請求項5に記載と同じであり、 $m$ 、 $n$ 及び $P^2$ は請求項7に記載と同じである。

7. 下記構造式に示すウロン酸残基を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。



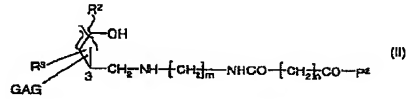
上記構造式中の $P^1$ は1級アミノ基を有する燐脂質を示し； $R^1$ はOH又は $OSO_3H$ を示し； $R^2$ はOH又は $OSO_3H$ を示す。

8. グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分、ガラクトース部分又はヘキササミン部分を還元することにより開裂し、さらに部分酸化により当該開裂部にアルデヒドを形成させ、当該アルデヒドに $NH_2-(CH_2)_m-NH_2$ を結合させた後、 $HOOCH-(CH_2)_n-COOH$ に結合した $P^2$ で示される燐脂質又は脂質を結合させることを特徴とする、請求項5又は7記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

9. グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分、ガラクトース部分又はヘキササミン部分を還元することにより開裂し、さらに部分酸化により当該開裂部にアルデヒドを形成させ、当該アルデヒドに $NH_2-(CH_2)_m-NH_2$ を結合させた後、 $HOOCH-(CH_2)_n-COOH$ に結合した $P^2$ で示される燐脂質又は脂質を結合させることを特徴とする、請求項5又は7記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

サミノグリカン残基を示し； $R^1$ はOH、 $OSO_3H$ 、H、 $NHCOCH_3$ 、又は $NHSO_3H$ 、Hを示し； $R^2$ は $COOH$ 、 $CH_2OH$ 又は $CH_2OSO_3H$ 、Hを示し； $R^3$ はOH又は $OSO_3H$ 、Hを示す。

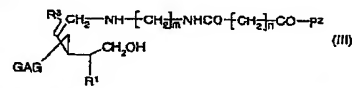
6. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^2$ は燐脂質残基又は脂質残基を示し； $m$ は1~8を示し； $n$ は1~10を示し； $GAG$ は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のウロン酸部分又はガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し； $R^1$ は $COOH$ 、 $CH_2OH$ 又は $CH_2OSO_3H$ 、Hを示し； $R^2$ はOH又は $OSO_3H$ 、Hを示す。

7. 一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 $P^2$ は燐脂質残基又は脂質残基を示し； $m$ は1~8を示し； $n$ は1~10を示し； $GAG$ は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチンポリ硫酸及びデルマタン硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のヘキササミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、又はケラタン硫酸もしくはケラタンポ

リ硫酸を結合させた後、 $HOOCH-(CH_2)_n-COOH$ に結合した $P^2$ で示される燐脂質又は脂質を結合させることを特徴とする、請求項5又は7記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

10. グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分、ガラクトース部分又はヘキササミン部分を還元することにより開裂し、さらに部分酸化により当該開裂部にアルデヒドを形成させ、当該アルデヒドに $NH_2-(CH_2)_m-NH_2$ を結合させた後、 $HOOCH-(CH_2)_n-COOH$ に結合した $P^2$ で示される燐脂質又は脂質を結合させることを特徴とする、請求項5又は7記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

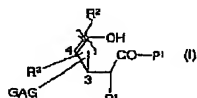
11. グリコサミノグリカンのウロン酸残基中に存在するカルボキシル基と、燐脂質の1級アミノ基とを化学的に結合させることを特徴とする、請求項9記載の燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

12. 化学的に結合させる反応を、縮合剤の存在下に行うか、あるいはウロン酸残基のカルボキシル基を活性化して行うことを特徴とする、請求項13記載の燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

13. グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択される少なくとも1種のグリコサミノグリカンであることを特徴とする、請求項10~14いずれか一項記載の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

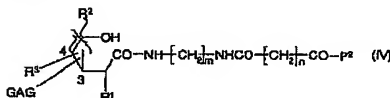
「本発明の濃脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンにはグリコサミノグリカンの還元末端に直接又はスパーサーを介して濃脂質又は脂質が結合したもので、あるいは構成成分のカルボキシル基に濃脂質又は脂質が結合したものである。前者はグリコサミノグリカンの還元末端に濃脂質又は脂質が化学的に結合しているものである限りその結合方法は限定されず、濃脂質又は脂質が直接結合していても、あるいはスパーサーを介して結合していてもよい。また後者はグリコサミノグリカンの糖鎖骨格の構成成分の官能基に、濃脂質又は脂質が直接又はスパーサーを介して結合しているものであるとてよい。

### (1) 一般式



上記式中、P<sup>1</sup> は1置アミノ基を有する炭基置換基を示し；GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルタチタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミングリコランから還元性末端のウロン酸部分、ガラクトース部分又はヘキシサミン部分を除いたグリコサミングリコラン残基を示し；R<sup>1</sup> はOH、OSO<sub>3</sub>H、NHCOCH<sub>3</sub>、又はNH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Hを示し；R<sup>2</sup> はCOOH、CH<sub>3</sub>OH又はCH<sub>3</sub>OSO<sub>3</sub>Hを示し；R<sup>3</sup> はOH又はOSO<sub>3</sub>Hを示す。

#### (4) 一般式

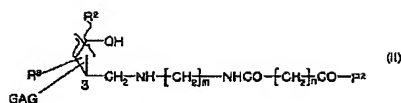


上記式中、GAG、R'、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は上記(1)に記載と同じであり、m、n及びP<sup>1</sup>は上記(2)に記載と同じである。

(M)

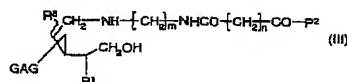
$$\text{GAG} - \left( \begin{array}{c} \text{CO-P}^1 \\ | \\ \text{Q} \\ | \\ \text{R}^2 \\ | \\ \text{R}^1 \end{array} \text{O} \right)_n \text{GAG} \quad (V)$$

(2) 一般式



上記式中、R<sup>a</sup>は炭素質残基又は脂質残基を示し、mは1〜8を示し、nは1〜10を示し、GA/Gは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、キタラン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のウロン酸部分又はガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、R<sup>b</sup>はCOOH、CH<sub>2</sub>OH又はCH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>Hを示し、R<sup>c</sup>はOH又はOSO<sub>3</sub>Hを示す。

### (3) 一般式



上記式中、P<sup>\*</sup>は燐酰質残基又は脂質残基を示し；mは1～8を示し；nは1～10を示し；GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸及びヒyaluronan残基からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のヘキсамン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、又はヒyaluronan残基あるいはヒyaluronanポリ硫酸から還元性末端のグラクツロース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し；R<sup>\*</sup>はOH又はNHCOCH<sub>3</sub>を示し；R<sup>\*</sup>はOH又はNHCOCH<sub>3</sub>、H-

本明細書中における化学構造式に記載の波線は、当該波線に結合した基の化学構造式中の炭素原子への結合の上下の向き、すなわち立体配置が限定されないことを示し；片括弧により括弧された構造に結合する基は、当該構造が存在する異性体と糖基残基、糖基基関鎖前記に3位及び4位であった炭素原子にそれぞれ結合するのであればその位置は特に限定はされないことを示す。